



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra klinických a preklinických oborů

Bakalářská práce

# Bakteriologické vyšetření hemokultury

Vypracoval: Natálie Majerová

Vedoucí práce: Prof. MUDr. Miloš Velemínský, CSc., dr.h.c.

České Budějovice 2015

## **Abstrakt:**

Cílem této bakalářské práce je seznámení se s možnostmi vyšetření hemokultur, osvojení si metodiky vypracování manuálních a automatizovaných hemokultur v laboratoři Stafila a na oddělení bakteriologie v Nemocnici České Budějovice, a.s., dále porovnání těchto dvou systémů a naučení se základní interpretace výsledků.

V teoretické části jsem se věnovala infekcím krevního řečiště, sepsi a její diagnostice, nozokomiálním nákazám a v poslední části se věnuji nejčastějším bakteriálním původcům infekce krevního řečiště.

V praktické části se věnuji postupu zpracování hemokultur, nejdříve preanalytické fázi, která zahrnuje odběr vzorku a jeho transport. A poté fázi analytické, ve které jsou popsány kultivační lahvičky, základní metody pro průkaz bakterií jako je zpracování mikroskopického preparátu a kultivace bakterií. V další části se věnuji bližšímu určení bakteriologického druhu a stanovení citlivosti na antibiotika. V poslední části jsou zahrnuty výsledky kultivace sledovaného souboru a to z obou metod. Pozitivní nález se vyskytl v 20% odebraných hemokultur.

**Klíčová slova:** Hemokultura, metody, infekce krevního řečiště, sepse, původci bakteriemié

## **Abstract**

The aim of this bachelor thesis is the introduction of possibilities of hemoculture examination, assuming the methodology of evolving the manual and automated hemocultures in the Stáfila laboratories and at the Department of Bacteriology in the Hospital of České Budějovice. Then it deals with the comparison of those two systems and learning the basic interpretation of results.

In the theoretical part I focus on blood circulation infections, sepsis and its diagnostics and nosocomial infections. The last part deals with the most frequent bacterial causes of blood circulation infections.

The practical part focuses on the approach of hemoculture process, firstly on the preanalytic part which includes the sample collection and its transport. Secondly there is the analytic part where cultivation bottles are described as well as the basic methods for bacteria certification such as making the microscopic sample and bacteria cultivation. The next part deals with the determination of a bacteria kind and its antibiotics sensitivity. In the last part there are results of cultivation of the followed up file from the both methods. Positive finding occurred in 20% of taken hemocultures.

Key words: Blood culture, methods, bloodstream infection, sepsis, bacteraemia originators

## **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 10. 8. 2015

.....

(Natálie Majerová)

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat Prof. MUDr. Miloši Velemínskému. CSc., vedoucímu mé práce za její vedení. Dále bych ráda poděkovala MUDr. Věře Cihlové a zaměstnancům Nemocnice České Budějovice za pomoc při zpracování. Velké díky také patří mé rodině a přátelům za podporu a pomoc jak při zpracování mé práce, tak po celou dobu mého studia.

# Obsah

Seznam použitých zkratk	9
Úvod	10
<b>1 Bakteriologické vyšetření hemokultur</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Infekce krevního řečiště</b>	<b>11</b>
1.1.1 SIRS	12
1.1.2 Sepse:	13
1.1.3 Těžká sepse	14
1.1.4 Septický šok:	14
1.1.5 MODS	14
<b>1.2 Mortalita sepse</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Nozokomiální infekce</b>	<b>15</b>
1.3.1 Rozdělení nozokomiálních infekcí	15
1.3.2 Katérové infekce	16
<b>1.4 Lidé a mikroorganismy</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Laboratorní diagnostika sepse</b>	<b>17</b>
1.5.1 Mikrobiologická diagnostika	17
1.5.1.1 Přímý mikrobiologický průkaz:	18
1.5.1.2 Lahvička Oxoid signal	18
1.5.1.2.1 Lahvičky BioMérieux	19
1.5.1.2.1.1 Pístroj BacT/ALERT 3D	20
1.5.1.2.2 Mikroskopie	21
1.5.1.2.3 Kultivační průkaz	22
1.5.1.2.3.1 Základní půdy pro kultivaci	22
1.5.1.2.3.2 Zvolení půd pro kultivaci	24
1.5.1.3 Nepřímý mikrobiologický průkaz:	25
1.5.2 Hematologické vyšetření	25
1.5.3 Biochemické vyšetření:	26
<b>1.6 Nejčastější bakteriální původci infekcí krevního řečiště</b>	<b>27</b>
1.6.1 Gram pozitivní koky	28
1.6.1.1 Streptokoky	28
1.6.1.1.1 Streptococcus agalactiae	28
1.6.1.1.2 Streptococcus pyogenes	28
1.6.1.1.3 Streptococcus pneumoniae	29
1.6.1.1.4 Ostatní streptokoky	29
1.6.1.2 Rod <i>Staphylococcus</i>	29
1.6.1.2.1 Koaguláza pozitivní stafylokoky	30
1.6.1.2.2 MRSA – Meticilin-rezistentní kmeny <i>Staphylococcus aureus</i>	30
1.6.1.2.3 Koaguláza negativní stafylokoky	30
1.6.1.3 Rod <i>Enterococcus</i>	31
1.6.2 Gram negativní koky	31
1.6.2.1 <i>Neisseria meningitidis</i>	31

1.6.3	Gram pozitivní tyčky.....	32
1.6.3.1	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	32
1.6.3.2	Rod <i>Bacillus</i> .....	32
1.6.3.3	Rod <i>Corynebacterium</i> .....	33
1.6.4	Gram negativní tyčky.....	33
1.6.4.1	Čeleď <i>Enterobacteriaceae</i> .....	33
1.6.4.1.1	Rod <i>Salmonella</i> .....	33
1.6.4.1.2	Rod <i>Escherichia</i> .....	34
1.6.4.1.3	Rod <i>Enterobacter</i> .....	34
1.6.4.1.4	Rod <i>Klebsiella</i> .....	35
1.6.4.1.5	Rod <i>Proteus</i> .....	35
1.6.4.2	Rod <i>Campylobacter</i> .....	35
1.6.4.3	Rod <i>Haemophilus</i> .....	36
1.6.4.4	Rod <i>Pseudomonas</i> .....	36
1.6.5	Kvasinkoví původci.....	37
<b>1.7</b>	<b>Výskyt Bakteriálních původců infekcí krevního řečiště.....</b>	<b>37</b>
1.7.1	Infekce krevního řečiště u dětí.....	38
<b>2</b>	<b>Cíle práce.....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>Metodika.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Preanalytická část vyšetření.....</b>	<b>40</b>
3.1.1	Odběr vzorku.....	40
3.1.2	Transport vzorku.....	41
<b>3.2</b>	<b>Analytická část vyšetření.....</b>	<b>41</b>
3.2.1	Automatizované zpracování přístrojem BacT/ALERT 3D.....	41
3.2.1.1	Připravení mikroskopického preparátu:.....	42
3.2.1.1.1	Barvení dle Grama:.....	42
3.2.1.2	Rozočkování vzorku na pomnožovací půdy po vyjmutí z přístroje BacT/ALERT.....	43
3.2.2	Manuální zpracování hemokultur.....	44
3.2.2.1	Rozočkování vzorku na pomnožovací půdy po manuálním vyšetření:.....	45
3.2.3	Negativní hemokultury.....	45
3.2.4	Dourčování druhu bakterie z pozitivních vzorků.....	45
<b>4</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>První pozitivní hemokultura.....</b>	<b>46</b>
4.1.1	Test rozpustnosti ve žluči.....	46
4.1.2	Test Latex aglutinací.....	47
4.1.3	Optochinový test.....	48
4.1.4	Citlivost na antibiotika.....	49
4.1.5	E-test.....	50
4.1.6	STREPTOtest 24.....	51
4.1.7	Tabulka zhodnocení výsledků.....	52
<b>4.2</b>	<b>Druhá pozitivní hemokultura.....</b>	<b>52</b>
4.2.1	Test hyaluronidasa.....	53
4.2.2	Test Koagulace.....	53

4.2.3	Test citlivosti .....	54
4.2.4	STAPHYtest 24.....	54
4.2.5	Tabulka zhodnocení výsledků .....	55
<b>4.3</b>	<b>MALDI –TOF.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4</b>	<b>Nález positivity .....</b>	<b>57</b>
4.4.1	Diagnózy pacientů, kterým byla hemokultura odebrána.....	58
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>59</b>
5.1	Porovnání zpracování mikrobiologických laboratoří Stafila a Nemocnice České Budějovice a.s.....	59
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>65</b>



## Seznam použitých zkratk

<b>CO<sub>2</sub></b>	Oxid uhličitý
<b>DIC</b>	Diseminovaná intravaskulární koagulopatie
<b>IKR</b>	Infekce krevního řečiště
<b>IL</b>	Interleukin
<b>JIP</b>	Jednotka intenzivní péče
<b>LIS</b>	Laboratorní informační systém
<b>MIC</b>	Minimální inhibiční koncentrace
<b>MODS</b>	Multiple organ dysfunction syndrome
<b>MRSA</b>	Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>NaCl</b>	Chlorid sodný
<b>O<sub>2</sub></b>	Kyslík
<b>SIRS</b>	Systemic inflammatory response syndrome
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor

# Úvod

Hemokultivační vyšetření slouží k prokázání bakterií cirkulujících v krvi pacienta. Infekce krevního řečiště je velice závažný problém. Nejčastějšími původci jsou bakterie a houbovité organismy. Sepse a infekce krevního řečiště může způsobit multiorgánové selhání a dokonce ohrozit pacienta na životě. Máme-li tedy podezření na infekci, je nutné vyšetřit krev na hemokulturu, která nám podezření může nejen potvrdit, ale i určit druh patogenu, který infekci způsobuje. Patří tedy mezi nejdůležitější mikrobiologické vyšetření.

Důležitý je také správný odběr vzorku, aby se zamezilo kontaminaci a následně falešné pozitivitě výsledku.

Krev na vyšetření hemokultury se většinou odebírá lidem se zvýšenou teplotou, bez nezjištěné příčiny, lidem se zvýšenou tepovou frekvencí, leukocytózou a zánětlivými markery v krvi.

V mé bakalářské práci se Vám budu snažit objasnit, jak závažný problém může infekce v krevním řečišti představovat, hlavní patogeny způsobující tuto infekci a jaké onemocnění zapříčiňují. V praktické části práce se pak zaměřím na jejich průkaz metodami automatickými nebo manuálními a jejich srovnání.

Hlavními cíli mé práce je osvojení si metodiky vyšetřování hemokultur v Nemocnici České Budějovice, a.s. a laboratoři Stafila, jejich následné porovnání a interpretace výsledků.

## 1 Bakteriologické vyšetření hemokultur

Mikrobiologické vyšetření hemokultur je důležité vyšetření sloužící k průkazu infekčního onemocnění a bakterií v krvi pacienta. Jde o odběr žilní krve do hemokultivačních lahviček, které se následně kultivují, a během několika dnů zjistíme, zda-li se bakterie v krvi nachází a následně i o jaký druh bakterie se jedná. Pokud je přítomnost životaschopných bakterií v krvi prokázána, označujeme tento stav jako bakteriémie (7) :

Dělíme je na bakteriémii

1) dle obsahu bakterií v 1 mililitru krve

- Nízkou – 10 – 20 bakterií v 1 ml krve
- Střední – 50 bakterií v 1 ml krve
- Vysoká 80 a více bakterií v 1 ml krve

2) Dle výskytu bakterií v krvi

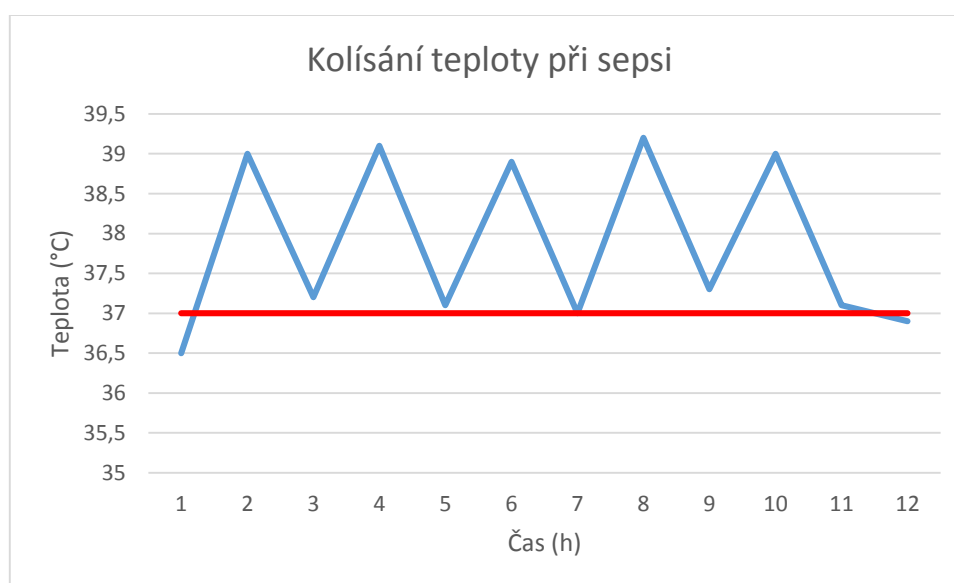
- Přechodná bakteriémie – je pouze přechodná po dobu několika minut a je spojena s různým poraněním, vytřením zubu, chirurgickými zákroky, katetrizací močových cest nebo lokálních infekcích.
- Intermittentní bakteriémie – opakující se přechodná bakteriémie. Vyskytuje se při pneumokokové pneumonii
- Kontinuální bakteriémie – závažná infekce, kterou byla prolomena obrana člověka. Je spojována s intravaskulární infekcí. (7,26)

### 1.1 Infekce krevního řečiště

Děj, při kterém je bakteriémie doprovázena klinickými příznaky, je značen jako infekce krevního řečiště (IKR). Prostupující mikroby do krevního řečiště, se dále rozvíjí do organismu a navozují chorobný stav s vysokou mortalitou. Tento stav je doprovázen celou škálou symptomů s typickým průběhem teplotní křivky, tj. v průběhu 24 hodin se střídají vysoké teploty s nízkými „skákavé tepoty“, dále hypotenzí, tachykardií, zimnicí,

třesavkou, v krevním obrazu taky můžeme nalézt leukocytózu a neutropenii. Infekce krevního řečiště může být rozdělena do dvou hlavních skupin. Pokud jde o stav, při kterém je zdroj infekce přímo v krevním řečišti, jedná se o infekci primární, tvoří 5- 30% všech infekcí krevního řečiště a nejčastější infekcí je infekce cévního katetru. Pokud je zdrojem infekce ložisko mimo krevní řečiště, ze kterého se pak mikroorganismy do krve dostávají, jedná se o infekce sekundární (3, 7, 28).

Graf 1 – kolísání teplot při sepsi



### 1.1.1 SIRS

Neboli systémová zánětlivá odpověď = systemic Inflammatory Response Syndrome. Jde o nepřiměřenou reakci těla na bakteriální infekci spuštěnou cytokiny. Nastává, když se zánětlivé mediátory dostanou do celkového oběhu. Příčina však nemusí být nutně bakteriální, často dochází k SIRS při popáleninách, nebo v šokových stavech (3, 6, 7, 9)

### 1.1.2 Seps:

podskupina SIRS (systémová zánětlivá odpověď). Je to syndrom značený infekcí a systémovou zánětlivou odpovědí. Je to velmi závažný stav, který je bez terapie život ohrožující. Je to celková těžká infekce, při které pacient reaguje imunitní odpovědí podle infekci způsobujícího mikroba. Může propuknout u kohokoliv, ale většinou ji diagnostikujeme u pacientů po popáleninách, vážných poraněních, onkologických pacientů, se záplem plic atd. Správná diagnostika sepsy může být obtížná, protože její příznaky jako je horečka, zrychlený puls, problémy s dýcháním, nebo změny v počtu leukocytů, většinou se vyskytují také nezralé formy buněk, můžeme nacházet i u řady jiných onemocnění jako například úraz či při srdečním selhání.

Klinické příznaky pro průkaz sepsy jsou:

- Zvýšená tělesná teplota nad 38 °C, nebo snížená tělesná teplota pod 35,6 °C
- Zvýšená dechová frekvence (tachypnoe) – a to nad více než 20 nádechů/minutu
- Zvýšená tepová frekvence (tachykardie) – nad více než 90 úderů/ minutu
- Leukocytóza > 15 000 buněk na 1 mikrolitr
- více než 10 % nezralých neutrofilů (tyček)
- Nechutenství, nauzea, průjem, zvracení, třesavka, nechut', vyčerpanost
- Zvětšení sleziny, psychická změny, projevy na kůži
- Poškození vědomí, které může přejít až v septický šok

Tyto klinické nálezy mohou samozřejmě také imitovat i jiné nemoci, není tedy jisté, že pokud se tyto příznaky u pacienta nachází, můžeme stanovit s jistotou diagnózu, že se jedná o septický stav. Je však nanejvýš důležité včasné správně diagnostikovat, pokud by se o sepsi jednalo, musíme ihned zjistit místo infekce a zahájit účinnou terapii, abychom předešli postižení až selhání orgánů či dokonce smrti. (3, 7, 22, 24).

### **1.1.3 Těžká seps**

Při těžké sepsi dochází k orgánové dysfunkci. Dochází také k hypoperfúzi nebo hyperperfúzi tkání, to se může projevit oligourii, acidózou, hypoxií.

### **1.1.4 Septický šok:**

Jedná se o zdravotní stav ohrožující pacienta na životě. Vzniká z těžké sepsy spojenou se sníženým systolickým tlakem pod 90 torr (hypotenze). Dochází k hypoxii tkání, nedostatečnému prokrvení tkání a tedy selhání orgánů. Dlouhodobé přežití pacienta v septickém šoku není optimální. Seps, těžká seps a septický šok je po sobě jdoucí proces. Liší se rozličným stupněm vědomí a poruchy orgánů (22, 7).

### **1.1.5 MODS**

Syndrom mnohočetného orgánového selhání (multiple organ dysfunction syndrome) Jedná se o závažný stav s poruchou dvou a více orgánů, který si žádá neprodlenou terapii k udržení organismu v homeostáze. K selhání orgánového systému dochází většinou postupně a dělíme ho na dva druhy. Primární MODS, který je vyvolán prudkou neinfekční reakcí jako je popálení, trauma a jiné. Dále máme sekundární MODS, který je vyvolán těžkou sepsí doprovázenou septickým šokem se sníženým průtokem krve v orgánech (7, 22, 30).

## **1.2 Mortalita sepsy**

Mortalitu sepsy u pacientů lze určit velmi obtížně, jelikož většina pacientů s diagnostikovanou sepsí je léčena ještě s alespoň jedním onemocněním a smrt pak bývá přiřazena právě onemocnění, které sepsu doprovází. Udává se však, že u pacientů se SIRS je mortalita 6-27 %, u sepsy 10-36%, v případě že se jedná o těžkou seps, nastává smrt

v 18-52 % případů, u septické šoku pak dosahuje mortalita až 82%. Při rozvoji sekundárního MODS je úmrtnost nad 80%. Mortalita také závisí na věku pacienta, na spolu probíhající onemocnění a na ložisku, ze kterého se rozvíjí. Větší úmrtnost pacientů pak také byla prokázána u sepsí způsobených gram negativními bakteriemi, enterokoky a mykotickými agens. Aby nedošlo k smrti pacienta je nutné sepsi včas a rychle diagnostikovat a zahájit vhodnou léčbu (7, 9, 14, 28).

### **1.3 Nozokomiální infekce**

Jedná se o nemocniční nákazu, která se velmi často podílí na vzniku sepse a právě sepse nozokomiálního původu se v České republice vyskytují nejčastěji. Nejvíce dochází k diagnostice sepse nozokomiálního původu z jednotky intenzivní péče, nebo u pacientů se zavedeným močovým katetrem.

Za nozokomiální (nemocniční) nákazu je považována lokalizovaná nebo systémová reakce organismu na infekčního původce, který při přijetí do zdravotnického zařízení nebyl přítomen. Vznikla tedy v souvislosti s pobytem v zařízení. Jako inkubační dobu této infekce považujeme 48 hodin. Za nozokomiální infekci je však brána i infekce, která propukne až po uvolnění pacienta do domácí péče, nebo po transportu do jiné nemocnice, dále i infekce u pacienta, u kterého byla stanovena bakteriémie a byl v posledních deseti dnech hospitalizován. Mezi nozokomiální infekce však nemůžeme řadit nákazy, se kterými byl pacient přijat (zavlečené nozokomiální nákazy) (11, 23).

#### **1.3.1 Rozdělení nozokomiálních infekcí**

Dle původu dělíme infekce na exogenní a endogenní. Jako exogenní infekce jsou brány takové nákazy, u kterých je infekční agens do organismu zavlečeno zvenčí (pacienti, zdravotnický personál, infikované předměty). Naopak u endogenních nákaz

víme, že infekci vyvolává vlastní infekční agens, které je z místa kolonizace zataženo jinam, stává se tak krví například při operacích, nebo při oslabení těla po imunosupresivní léčbě, ozáření atd. Nejčastěji však dochází k přenosu nozokomiálních infekcí nedostatečnou hygienou rukou personálu. Dále jsou nozokomiální nákazy rozděleny podle postiženého místa či orgánu. Nejčastěji jde o infekce urogenitální, gastrointestinální, respirační a infekce ran. Nejvíce časté jsou infekce krevního řečiště cévními katetry.

### **1.3.2 Katéetrové infekce**

Jsou nejnebezpečnější. Při vzniku sepse ze zavedení katetru hraje velkou roli věk, nejnáchylnější jsou samozřejmě kojenci a starší lidé na 60 let věku. Důležitý faktor je také stav kůže, poraněná či popálená kůže, nebo dokonce ztráta kůže má rozvoj sepse samozřejmě mnohem větší předpoklady. Při zavádění katetru často dochází k zatažení mikroflóry nebo kontaminace kůže do krevního řečiště. Dalším způsobem vzniku infekce může být kontaminovaný infuzní roztok nebo část jeho soupravy.

Jako katéetrovou infekci lze označit bakteriémiu u pacienta, u kterého byla prokázána pozitivita krve, má příznaky infekce a není u něj patrný jiný původ nákazy kromě katétrů (7, 13, 23, 28)

## **1.4 Lidé a mikroorganismy**

Symbióza – Jedná se o společné soužití dvou či více organismů. Toto soužití můžeme rozdělit ještě na 3 různé podoby:

- Mutualismus - vztah dvou organismů, při kterém jsou si oba účastníci vzájemně prospěšní



- Komensalismus - Vztah dvou organismů, při kterém je tento vztah pro jeden organismus výhodný a druhého účastníka nijak nepoškozuje ani mu neprospívá, není tedy tímto vztahem nijak ovlivněn.
- Parazitismus - Vztah dvou organismů, při kterém je jedna strana poškozována, zatímco druhá strana z tohoto vztahu profituje, tedy jí prospívá.

Obor mikrobiologie se však zabývá v první řadě patogenními mikroorganismy, které mají schopnost u člověka vyvolávat onemocnění. Mikroorganismy (tedy původci onemocnění) a jejich patogenní působení způsobuje v makroorganismu infekci. Infekci tedy můžeme brát jako parazitismus mikroorganismu na hostiteli, kterého poškozuje. Průběh této nákazy je ze strany mikroorganismu závislý také na patogenitě (schopnost druhu vyvolat onemocnění) určitého infekčního agens, jeho infekční dávkou a virulencí (stupeň patogenity určitého kmene mikroba). U makroorganismu záleží na jeho vnímavosti, odolnosti a specifické imunitě a také na jeho duševním, fyzickém a zdravotním stavu (28, 2).

## **1.5 Laboratorní diagnostika sepse**

Laboratorní diagnostika je u stanovení sepse velice nesnadná. Nejdůležitější je mikrobiologická diagnostika a to jak již bylo zmíněno průkaz bakterií z krve pacienta, která musí být spojena s klinickými symptomy sepse. Neexistuje však laboratorní ukazatel, který by mohl sepsi spolehlivě diagnostikovat. Diagnózu provádíme několika způsoby: (7, 14, 24)

### **1.5.1 Mikrobiologická diagnostika**

Mikrobiologická diagnostika je pro určení septického stavu asi nejdůležitější. Pomocí mikrobiologie zjistíme, jaký původce infekci způsobuje, jeho taxonomické

zařazení a následně i jeho citlivost k antibiotikům. Vyšetřovaným materiálem pro průkaz bakterií je krev, odebírána do hemokultivačních lahvíček. Pokud však chceme lokalizovat zdroj infekce, potřebujeme materiály jako je mozkomíšní mok, moč, sputum, hnis, stěry z dutin apod. (2, 3).

Mikrobiologické metody vyšetření dělíme ještě do dvou základních skupin

#### **1.5.1.1 Přímý mikrobiologický průkaz:**

Průkaz žijícího, nebo již mrtvého mikroba, jeho povrchové struktury, části a charakteristické látky, jako třeba nukleovou kyselinu, enzymy, různé toxiny a produkty metabolismu. Pro přímý průkaz musí být krev odebrána do hemokultivačních lahvíček. Hemokultivační lahvičky mohou mít laboratoře rozdílné.

#### **1.5.1.2 Lahvička Oxoid signal**

Tato lahvička obsahuje 80 ml bujónu, který podporuje růst aerobních, anaerobních a mikro-aerofilních mikroorganismů. Obsah bujónu má pH 7 a jeho složení je: sójový extrakt, želatina, extrakt z kvasnic, masový extrakt, chlorid sodný, dusičnan draselný, glukóza, L-arginin, pyruvát sodný, cystein HCl, hydrogen-uhličitan sodný, fosfátový pufr, sodík polyanethol sulfonát, dithiothreitol, adenin sulfát, sukcinát sodný, chlorid amonný, síran hořečnatý, menadion.

Toto médium je vyvinuto tak, že plyn z rostoucích organismů vyvíjí tlak v uzavřené nádobě a ten vytlačí bujón s krví do signální nádoby (18).



Obr. 1 – Pozitivní a negativní lahvička Oxoid signal

#### 1.5.1.2.1 Lahvičky BioMérieux

Krev je odebrána do hemokultivačních lahviček BioMérieux pro kultivaci v přístroji BacT/ALERT. Těchto lahviček je 5 různých druhů.

1. Modrá Lahvička Bact/ALERT SA – pro aerobní kultivaci pacienta bez antibiotik. Lahvička obsahuje 40 ml média, které je obohacené Kaseinem, komplexem aminokyselin a sacharidů, sójovou hmotou. Prostředí má obohacené o CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub>
2. Fialová lahvička Bact/ALERT SN - pro anaerobní a fakultativně anaerobní kultivaci bez antibiotik. Obsahuje kasein, menadion, hemin, sojovou hmotou, komplexem aminokyselin a sacharidů a redukční agens. Prostředí je obohacené o CO<sub>2</sub> a N<sub>2</sub>.
3. Zelená lahvička Bact/ALERT FA – Po podání antibiotik (tato lahvička částečně redukuje účinek antibiotik). Pro aerobní kultivaci. 40 ml média obsahuje sójový extrakt, pyridoxinhydrochlorid, menadion, hemin, L –

cystein, aktivní uhlí a komplex aminokyselin a sacharidů. Prostředí je obohacené o O<sub>2</sub>. Je lepší k zachycení bakterie Burkholderia a kvasinek.

4. Oranžová lahvička Bact/ALERT FN – Po podání antibiotik. Pro anaerobní a fakultativně anaerobní kultivaci. Médium o 40ml obsahuje sojový extrakt, hemin, menadion, pyridoxinhydrochlorid, L- cystein, aktivní uhlí a komplex aminokyselin a cukrů. Prostředí má obohacené o N<sub>2</sub>. Toto médium zachycuje více stafylokoků a enterobakterií.
5. Žlutá lahvička Bact/ALERT PF – Pro pediatrické pacienty, nebo pro pacienty, kterým lze odebrat jen malé množství krve. Médium o objemu 20ml obsahuje sojový extrakt, pyridoxinhydrochlorid, hemin, menadion, L-cystein, komplex aminokyselin a sacharidů, aktivní uhlí, Prostředí je obohacené o O<sub>2</sub> (4, 12, 16).



Obr – 2 – hemokultivační lahvičky BioMérieux

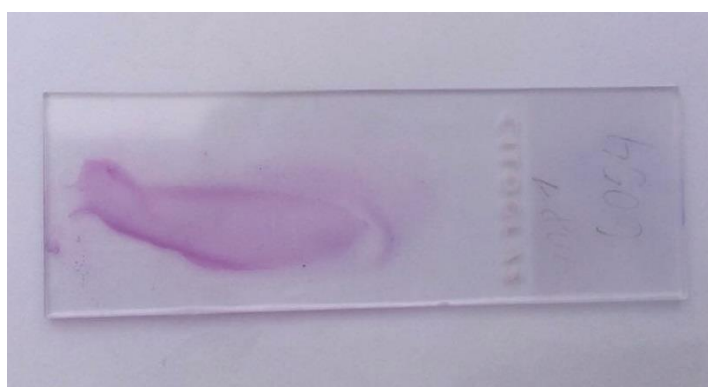
#### 1.5.1.2.1 Přístroj BacT/ALERT 3D

Přístroj pro kultivaci lahviček BioMérieux. šetří čas a pomáhá předcházet chybám, okamžitě rozpoznává pozitivní lahvičku s hemokulturou a výsledek hlásí. Jeho základním prvkem je temperovaná skříň, ve které jsou umístěny bloky s 24 otvory, které jsou značeny čísly na lahvičky BioMérieux. Za každým otvorem je dioda vyzařující paprsek červeného světla a hodnotící fotodioda. Měření se opakuje po každých deseti minutách.

Princip detekce je založený na vzniku CO<sub>2</sub>, který vzniká při pomnožování bakterií. Pokud přístroj určí pozitivní nález, je lahvička vyndána a dále zpracovávána pro určení kmene bakterie a citlivosti na antibiotika (1, 12, 16).

### 1.5.1.2.2 *Mikroskopie*

Naprosto základní vyšetření pro stanovení bakteriálního původce infekce krevního řečiště. Jedná se o zobrazení mikroba pod optickým, nebo elektronovým mikroskopem. Pod správným mikroskopickým zařízením a na dobrém preparátu může pozorující lékař zhodnotit strukturu bakterie (rozezná tedy zda-li se jedná o kok či tyčinku). U bakterií rozezná i jejich spojení do shluků, řetízků, po dvojicích či čtveřicích u koků. U tyčinek ve dvojicích, řetízcích či palisádách. Tvar u koků lze rozpoznat kulatý nebo lehce zploštělý, tyčinky rozlišujeme rohličkový a spirálovitý tvar. Hlavním parametrem rozlišení bakterií pod mikroskopem je však především určení toho, zda se jedná o Gram pozitivní nebo Gram negativní bakterii. Abychom k tomuto rozpoznání došli, musíme nejprve obarvit preparát dle Grama. Po tomto barvení se stěna Gram pozitivních bakterií zbarví do modra, zatímco Gram negativní bakterie budeme pozorovat jako červené. Mikroskopické vyšetření je celkem rychlá metoda, po většinu případů ale s nízkou citlivostí a specificitou (26, 27, 28)



Obr.3 - mikroskopický preparát barvený dle Grama.

### **1.5.1.2.3 Kultivační průkaz**

Další přímou metodou je kultivace. Tento průkaz spočívá v pomnožení bakteriálního původce. Jedná se o pomnožení na kultivačních půdách buďto pevného nebo tekutého složení (ty jsou používány spíše jako pomnožovací médium). Účelem kultivace je výtěžek čisté kolonie patogena, ze které budeme moci s určitou jistotou stanovit rod a druh kultivované bakterie. Kultivační průkaz je citlivý i specifický, na druhou stranu je kultivace vyšetřením, které patří mezi pomalejší. Měly bychom jím dojít k získání čistých kolonií (pomnožená skupina bakterií) určitého druhu bakterie, které pak využijeme ke konkrétnějšímu dourčení. Pro vznik čistých kolonií z pevných půd je důležité správné rozočkování vzorku. Pro úspěšnou kultivaci je pak nutné, aby bakterie měly vhodné podmínky k růstu, jako je správné pH, osmotický tlak, zvolit správné kultivační médium, teplotu a atmosféru. Pro většinu bakterií je vhodná teplota 37 °C (jako je teplota lidského těla) (2, 26)

#### **1.5.1.2.3.1 Základní půdy pro kultivaci**

##### **Krevní agar:**

Nejpoužívanější a nejzákladnější půda pro kultivaci bakterií v mikrobiologii. Je vhodná pro určení většiny lidských mikrobů. Je tvořena 5-10 % beraních erytrocytů. Připravuje se přidáním defibrilované ovčí krve k agarovému gelu při 40 °C. Krevní agar s naočkovaným materiálem dáme do termostatu se zvýšenou tenzí CO<sub>2</sub>, nebo do normálního termostatu s přidáním CO<sub>2</sub> vyvíječe. Následně inkubujeme při 36 °C následujících 24 hodin.

**MacConkey agar:**

Selektivně-diagnostická půda s obsahem žlučových solí, která inhibuje růst gram pozitivních mikrobů, půda je tedy určena pro růst hlavně gram negativních bakterií. Obsahuje laktosu a je tím je schopna rozlišovat gram negativní bakterie, které štěpí a neštěpí laktosu. Indikátorem štěpení jsou červené kolonie, pokud bakterie laktosu neštěpí, vyrůstají kolonie bezbarvé.

**Masopeptonový bujón:**

Tekutá pomnožovací půda z masového extraktu, NaCl, peptonu o pH 7,3. Používán pro pomnožení bakterií. Do Zkumavky s tímto bujónem se přidává krev. Tento bujón lze použít pro rozlití na půdy na stanovení citlivosti.

**Čokoládový agar:**

Pevná pomnožovací půda, která vzniká smícháním horkého agaru při 80 °C s krví, takže erythrocyty zhemolizují a agar získá hnědou (čokoládovou) barvu. Agar je vhodný pro bakterie, které nedovedou živiny z krevního agaru využít. Je vhodný pro hemofily, meningokoky a pro diagnostiku kapavky.

**Shaedler agar:**

Neselektivní půda používající se pro kultivaci citlivých anaerobních bakterií. V této půdě je obsažen vitamin K<sub>1</sub> a hemin. Naočkované půda se inkubuje 48 hodin při 37 °C v anaerobním prostředí.

**Muller-Hinton agar**

Tato půda se používá pro stanovení citlivosti bakterií na antibiotika. Pokud zjistíme, jaká bakterie způsobuje infekci krevního řečiště, nejspíše bude nasazena antibiotická léčba, protože antibiotik je v dnešní době několik druhů, je třeba

vybrat to nejvhodnější, stanovíme tedy citlivost na antibiotika. Pro stanovení citlivosti u gram negativních tyčků a gram pozitivních koku v hloučcích použijeme půdu Muller-Hinton. Pro Gram pozitivní koky v řetízcích volíme puđu Muller-Hinton agar s koňskou krví (7, 16, 28)

#### **1.5.1.2.3.2 Zvolení půd pro kultivaci**

##### **Všechny pozitivní hemokultury:**

Očkujeme na krevní agar a Schaedlerovu půdu. Krevní agar necháme inkubovat při 37°C v atmosféře s 5-10 % CO<sub>2</sub> po 48 hodin a mohou zde narůst jakékoliv organismy. Na Schaedlerově půdě inkubujeme anaerobně 48 hodin v anaerobním prostředí a narůst by měly anaeroby.

##### **Gram negativní tyčinky a diplokoky**

Při tomto nálezu očkujeme bakterie na čokoládový agar, který inkubujeme 48 hodin při 37 °C v atmosféře s 5-10 % CO<sub>2</sub> a můžeme poté nalézt *Haemophilus species* nebo *Neisseria meningitidis*. Dále používáme MacConkey půdu, kterou inkubujeme aerobně při 37°C 24 hodin a jako výsledek očekáváme Enterobakterie.

##### **Anaeroby**

Pokud máme z mikroskopie podezření na anaeroby, vyočkujeme krev na Shaedlerův agar a inkubujeme anaerobně při 37 °C 40 hodin.

##### **Systémové mykotické infekce**

Máme-li podezření na houbovou infekci, použijeme jako puđu pro kultivaci Sabouradův agar, který inkubujeme při 30 °C v aerobním prostředí a výsledek odečítáme po dvou dnech.



### **Pokud je negativní hemokultura, ale pozitivní růstová křivka**

Očkujeme mikroby na krevní agar a inkubujeme ho v mikroaerofilním prostředí po 3 dny. Dále na krevní agar s pruhem *Staphylococcus aureus*, který inkubujeme v atmosféře s 5-10 % CO<sub>2</sub> při 37 °C 48 hodin. Na McConkey agar, který kultivujeme aerobně po jeden den při 37°C. A na Schaedlerovu půdu na anaerobní kultivaci po 40 hodin při 37°C. (17)

#### **1.5.1.3 Nepřímý mikrobiologický průkaz:**

V nepřímém (serologickém) průkazu většinou dochází ke stanovování protilátek různých tříd. Nejčastější jsou metody jako komplement-fixační metody a imunochemické reakce jako je ELISA, nebo aglutinace. Imunochemické detekce, jejichž průkaz je postaven na základě reakce antigen-protilátka. Prokazujeme tak přítomnost patogenu, nebo specifické protilátky na daný antigen. V tomto případě jde o metodu aglutinace, při níž dochází k shlukování bakterií právě po spojení antigenu s protilátkou. Tato metoda bývá vysoce citlivá i specifická, v bakteriologii, tedy v tomto případě ale nemá příliš velké využití. Serologický průkaz se používá, jen když je průkaz kultivací obtížný. Pro mikrobiologickou detekci infekce krevního řečiště ale v podstatě používáme jen metody přímé (7).

#### **1.5.2 Hematologické vyšetření**

Při hematologickém vyšetření na infekci krevního řečiště věnujeme pozornost hlavně počtu leukocytů. U většiny pacientů je při sepsi nalezena leukocytóza a to buďto s velmi znatelným navýšením, nebo naopak leukopenií. Tento jev ale můžeme pozorovat i u jiných stavů než je sepse, například po úrazu, běžné infekci, nebo dokonce při stresu. Je nutné tedy provést diferenciál leukocytů, po kterém již můžeme bakteriální infekci

celkem spolehlivě rozpoznat. U sepse totiž při diferenciálu můžeme sledovat nepřítomnost eosinofilních granulocytů, zvýšený výskyt nezralých forem granulocytů a známky jejich aktivace, to znamená, že dojde k zvětšení granul. Tyto tři znaky lze považovat jako důvěryhodný stav pro diagnostiku sepse. K těmto změnám dochází velmi rychle, pohybují se v rozmezí několika hodin. Jako další znak sepse můžeme brát aktivaci krevního srážení a může dojít k DIC (diseminovaná intravaskulární koagulace), tím dochází k produkci TNF a aktivaci komplementu, dojde k poklesu hladiny inhibitorů krevního srážení jako je antitrombin a C-reaktivní protein, tím může dojít k vyčerpání srážecích faktorů a následně k celému utlumení fibrinolýzy (7, 8, 22)

### **1.5.3 Biochemické vyšetření:**

Jako základní biochemické ukazatele infekcí krevního řečiště bereme ty, které se podílejí na zánětlivých reakcích, dochází tedy ke zvýšení hladin jak prozánětlivých, tak i protizánětlivých cytokinů. Základní ukazatele jsou Interleukiny – 1, 6, 8, 10 (IL – 1, IL – 6, IL – 8, IL – 10) a Tumor necrosis factor alfa (TNF  $\alpha$ ). Ke zvýšení těchto cytokinů však může docházet i při procesu u nebakteriálních infekcí a u situací jako je srdeční selhání, popálenina či traumata. Jako další ukazatele při prokazování septického stavu můžeme brát proteiny akutní fáze a to C- reaktivní protein a prokalcitonin. Bylo prokázáno, že hladina C- reaktivního proteinu se při sepsi zvyšuje až tisíckrát, bohužel vyšší hladinu najdeme i u neinfekčních stavů, tudíž jeho specifita není příliš vysoká. Stejně tak prokalcitonin, u kterého se jeho zvyšující se hladina projeví také, protože je u sepse produkován téměř ve všech tkáních, jako ukazatel sepse je vhodnější. Jako další parametry při stanovování septického stavu lze brát snížení koncentrace kyslíku v krvi, respirační alkalózu, snížení hladin sodíku a albuminu a navýšení hodnot glukózy a laktátu. Biochemické vyšetření a vůbec celkově klinický průkaz sepse je vyšetření závislé na mnoha faktorech, které do sebe zapadají, a je nutné jejich stále sledování (7, 8, 20, 21, 22).

## 1.6 Nejčastější bakteriální původci infekcí krevního řečiště

Základně dělíme bakterie na 2 hlavní skupiny a to dle jejich tvaru, ten může být buďto kulovitý nebo protáhlý. Bakterie kulovitého tvaru nazýváme jako koky a ty mohou být buď oploštěné, nebo zašpičatělé, zatímco protáhlým formám bakterií říkáme tyčinky. Pokud jsou tyčinky krátké, značíme je jako kokobakterie, naopak velice protáhlé značíme jako vlákna, prohnuté jako vibria a spirálovitě zahnutým říkáme spirochety. Dle uspořádání pak dělíme bakterie na diplokoky, což je dvojice koků, dále na koky v řetízích, to vzniká, pokud se koky dělí ve stejné rovině a utvářejí řetízky po třech až dvaceti kociích. Koky dělené ve dvou rovinách a vyskytují se ve čtveřicích, značíme jako tetrády. Pokud je uspořádání nepravidelné, dochází k takzvaným shlukům. Na rozdíl od koků se tyčinky vyskytují spíše jednotlivě, ve vzácných případech po dvojicích tak zvané diplobacily, nebo v krátkých řetízích jako streptobacily.

Další hlavní skupinou klasifikace bakterií je rozdělení bakterií podle Gramova barvení. Výsledkem tohoto barvení lze zjistit mnoho vlastností mikroba. Obarvení záleží na stavbě bakteriální stěny a na schopnosti udržení barviva za účinku acetonu. Bakterie dle tohoto barvení dělíme na gram pozitivní a gram negativní. G+ bakterie se barví modře, zatímco G- bakterie červeně. Je to proto, že stěna gram negativních bakterií obsahuje více lipidů.

Třetím důležitým rozdělením je dle vztahu bakterií ke kyslíku. První skupinou jsou aerobní bakterie, které kyslík ke svému růstu potřebují. Dále máme anaerobní bakterie, ty rostou pouze bez přítomnosti kyslíku, který je pro ně toxický. Jako další známe fakultativně anaerobní druhy bakterií, tyto bakterie dokáží růst bez přítomnosti kyslíku, ale lépe se jim daří v prostředí, které kyslík obsahuje. Dále rozeznáváme mikroaerofilní a kapnofilní bakterie. Mikroaerofilní bakterie rostou nejlépe v prostředí, které obsahuje menší množství kyslíku než je v atmosféře a kapnofilní bakterie mají schopnost růstu pouze v atmosféře, kde je větší míra oxidu uhličitého.

Nejčastější bakteriální původce infekcí krevního řečiště jsem se rozhodla rozdělit do skupin koků a tyčinek na základě barvení dle Grama (26, 28).

## **1.6.1 Gram pozitivní koky**

### **1.6.1.1 Streptokoky**

Rod *Streptococcus* má jak patogeny, tak i bakterie, které jsou součástí běžné mikroflóry, například v dutině ústní, nebo horních dýchacích cestách. Jsou to koky, které se nejčastěji vyskytují buď v řetězcích, nebo jako diplokoky. Můžeme je rozdělit ještě podle typu hemolýzy a to na alfa, beta a gama hemolytické.

#### **1.6.1.1.1 *Streptococcus agalactiae***

Jedná se o Beta hemolytického streptokoka, je znám jako běžná mikroflóra na mandlích, pochvě nebo v dýchacím ústrojí. Je to však velmi nebezpečný patogen u novorozenců a těhotných žen, je to totiž nejznámější původce novorozeneckých meningitid, sepsí a pneumonií. Úmrtnost při nákaze se pohybuje kolem 5 – 10 %. Nebezpečí nastává při porodu, kdy může dojít k nákaze při průchodu porodními cestami. Onemocnění může probíhat dvěma typy - časným a pozdním. Při častých infekcích se příznaky projevují do několika dní a k nákaze dochází většinou při porodu. Zatímco infekce pozdní se dají zpozorovat po většinu případů až koncem prvního měsíce života kojence a k nákaze dochází často už po porodu.

#### **1.6.1.1.2 *Streptococcus pyogenes***

Jedná se o Beta hemolytický streptokok a řadíme ho do skupiny fakultativních anaerobů. Pro člověka je tento kok primárně patogenní. Je původcem infekcí hnisavého charakteru dýchacího systému či kůže, způsobuje onemocnění jako je například angína, růže či spála. Dále může způsobovat takzvané pozdní sterilní komplikace jako revmatickou horečku (onemocnění vznikající do měsíce po streptokokové neléčené

angíně, může při ní docházet k postižení srdce, centrální nervové soustavy, kloubů), nebo glomerulonefritidu. Po diagnostice streptokoka pyogenes je důležité zahájit antibiotikovou terapii, nejčastěji penicilinem.

#### **1.6.1.1.3 *Streptococcus pneumoniae***

Takzvaný pneumokok je alfa hemolytický viridující kok lancetovitého tvaru. Pneumokoky kolonizují sliznice horních dýchacích cest, jedná se o původce pneumonie, která je velmi častým infekčním onemocněním a je velmi nebezpečná především u kojenců a lidí důchodového věku, u těchto osob totiž může pneumokoková pneumonie končit smrtí. Je původcem i dalších onemocnění jako je zánět středního ucha, nebo meningitidy. *Streptococcus pneumoniae* je nebezpečný pro malé děti, hlavně z důvodu toho, že imunita proti tomuto patogenu se tvoří až kolem dvou let věku.

#### **1.6.1.1.4 Ostatní streptokoky**

Známe několik desítek druhů streptokoků, většinou jsou součástí běžné mikroflóry a to většinou v dutině ústní, mohou však za různých okolností (většinou zákroky v dutině ústní jako je vytržení zubu, nebo porušení dásně) vyvolávat endokarditidy, nebo přechodné bakteriémie. Zástupce této skupiny je třeba *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans* atd. (2, 13, 26, 27).

#### **1.6.1.2 Rod *Staphylococcus***

Jako další gram pozitivní koky způsobující bakteriémii jsou stafylokoky, jsou to neopouzdržené koky většinou se vyskytující ve shlucích, jsou to velmi odolné bakterie o velikosti kolem jednoho mikrometru. Jejich rozdělení spočívá ve schopnosti koagulace plasmy a to buď negativně, nebo pozitivně, dělíme je tedy koaguláza negativní a koaguláza pozitivní stafylokoky.

### **1.6.1.2.1 Koaguláza pozitivní stafylokoky**

Mezi nejdůležitějšího zástupce koaguláza pozitivních stafylokoků patří *Staphylococcus aureus* – tak zvaný zlatý stafylokok. Je to velmi častý lidský patogen, který přibližně v jedné třetině osidluje kůži nebo nos u lidí bez jakýchkoliv komplikací, při přemnožení začíná způsobovat malé kožní potíže, při porušení kožní bariéry se však začíná projevovat jeho patogenita. Jedná se o původce způsobujících infekci hlavně po úrazech, operacích, při nedostatečné imunitě nebo při zavedení katetru. Způsobuje infekce kůže po poraněních, přes záněty orgánu až po velmi závažnou sepsi. Pakliže se *S. aureus* dostane do krve, dojde k zánětu, infekci a v okolí ran dochází k hnisání. Jako terapii volíme buď antibiotickou léčbu, nebo chirurgický zákrok. Velké množství stafylokoků je ovšem dnes rezistentní na penicilin, musíme při léčbě tedy zvolit jinou antibiotickou látku nejčastěji oxacilin. Jsou ovšem objeveny i kmeny které mají na oxacilin také vybudovanou odolnost, značíme je jako MRSA.

### **1.6.1.2.2 MRSA – *Meticilin-rezistentní kmeny Staphylococcus aureus*.**

Je to častý původce nozokomiálních nákaz a jedná se o skutečně nebezpečný kmen stafylokoka. Tento kmen je rezistentní mimo penicilinu a oxacilinu i k velké skupině antibiotik skupiny Beta-laktamů. Při nákaze kmenem MRSA je s jeho rezistencí k antibiotikům tedy velmi obtížná a složitá terapie. Pacienti s touto nákazou bývají v nemocnicích hospitalizováni na oddělených lůžkách a je třeba dbát na vysokou úroveň hygieny, aby nedocházelo k šíření této nákazy (10).

### **1.6.1.2.3 Koaguláza negativní stafylokoky**

Tato skupina stafylokoků je po většinu případů běžně osidlující flóra kůže a sliznic. Nejčastěji izolovanými rody jsou bakterie vyskytující se ve shlucích jako je *Staphylococcus epidermis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*. Při patogenitě jsou to další

původci nozokomiálních nákaz u oslabených jedinců, často v souvislosti s umělými materiály jako jsou kloubní protézy, chlopenní náhrady nebo nitrožilní kanyly. Na těchto materiálech jsou schopny vytvořit tenkou vrstvu mikrobů (biofilm) a tím způsobovat infekci krevního řečiště. Dále také způsobují infekce ran. Záchyt těchto stafylokoků je třeba posuzovat velmi opatrně, může se totiž stát, že nalezený kmen byl nalezen jen díky tomu, že došlo ke kontaminaci kůže. Nejednalo by se tedy o sepsi.

### **1.6.1.3 Rod *Enterococcus***

Enterokoky jsou fakultativně anaerobní protáhlé koky v krátkých řetízích, které jsou normální součástí střevní mikroflóry – po většinou se vyskytují v tlustém střevě. Enterokoky způsobují infekce močových cest, endokarditidy, infekce operačních ran, gynekologické záněty a jsou také důležitými původci nozokomiálních nákaz, hlavně u pacientu dlouhodobě pobývajících v hospitalizačním zařízení. Po proniknutí enterokoků do krevního řečiště se může projevit enterokoková sepse. Mezi nejčastější zástupce řadíme *Enterococcus faecalis*, který vyvolává infekci z větší části případů až v 90 % a *Enterococcus faecium*. Tyto dva hlavní zástupci od sebe lze rozlišit pomocí testu štěpení arabinózy. Jsou to bakterie velmi odolné k vnějšímu prostředí a jejich kultivace není příliš náročná (2, 13, 26, 27)

## **1.6.2 Gram negativní koky**

### **1.6.2.1 *Neisseria meningitidis***

Je to jediný druh rodu *Neisseria* způsobující infekci krevního řečiště. Jde o primární patogen pro člověka a o původce meningitidy – říká se jí proto meningokok. Průběh meningitidy je velice rychlý, protože toto onemocnění propuká během několika hodin. Příznaky jsou stejně jako u sepse, která může být doprovázena zvracením, fleky na kůži,

horečkou, bolestí hlavy svalů a kloubů, křečemi a nadměrnou spavostí. Pokud se sepe přejde do těžší fáze, velmi rychle se poté rozvine do septického šoku a ten vede k ledvinovému selhání a selhání dýchacího ústrojí. Jde to život ohrožující onemocnění. Nejvíce ohrožené jsou malé děti a dospívající členové populace. Nejzávažnější komplikací je vznik DIC. Na meningokokové infekce existuje očkování, jejich výskyt se tedy v poslední době podařilo snížit (13, 28)

### **1.6.3 Gram pozitivní tyčky**

#### **1.6.3.1 *Listeria monocytogenes***

Je to gram pozitivní, fakultativně anaerobní krátká tyčinka, která kolonizuje trávicí trakt člověka. Je kultivačně nenáročná a přežívá i v extrémních podmínkách. K nákaze dochází většinou z kontaminovaných potravin, jako je nepasterizované mléko. Velké riziko představuje pro gravidní ženy a novorozence. U nosiček dětí může díky této bakterii dojít k potratu plodu, nebo k porození mrtvého dítěte. U novorozenců pak dochází k sepsi nebo meningitidě. U dospělých jedinců je tato infekce vzácná, nebo je při správné funkci imunitního systému doprovázena pouze mírnými příznaky. Jako vhodná terapie při listerióze je nasazení penicilinu.

#### **1.6.3.2 Rod *Bacillus***

Jedná se o rovné aerobní nebo fakultativně anaerobní tyčinky tak zvané bacily. Bakterie toho rodu dokáží produkovat antibiotické látky. Jako patogenní druhy jsou brány *Bacillus anthracis* jako původce antraxu a *Bacillus cereus* jako původce enterotoxikózy. Mají i klidové stádium (spory), ve kterém jsou schopny přežít i po několik let. Při nálezů v hemokultuře je však dobré zvážit, zda-li se nejedná o kontaminaci. Terapii je nasazení vysoké dávky penicilinu.



### 1.6.3.3 Rod *Corynebacterium*

Jde o aerobní nebo fakultativně anaerobní palisádově uspořádané tyčinky. Jako dva zástupce tohoto rodu bereme *Corynebacterium diphtheriae*, lidský patogen, který je původcem záškrtu (proti záškrtu je v České republice zavedeno povinné očkování) a *Corynebacterium jeikeium*, který je právě oportunním původcem vyvolávajícím sepsi a endokarditidu, zpravidla ale jen u osob s oslabenou imunitou zvláště po kardiokirurgických zákrocích. Často se jedná o nákazu nozokomiálního původu (13, 26).

## 1.6.4 Gram negativní tyčky

### 1.6.4.1 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Jde o čeleď fakultativně anaerobních nesporotvorných tyčinek, většina z nich je běžně se vyskytující bakterie lidského střeva a je brána jako součást přirozené mikroflóry člověka, některé jsou ale oportunně patogenní a způsobují infekce u imunitně oslabených jedinců, za to některé jsou tvůrci až smrtelných onemocnění. Tato čeleď je obsažena několika desítkami rodů, mezi nejznámější rody z čeledi *Enterobacteriaceae*, kterým se budeme níže věnovat, a jsou spjati s infekcí krevního řečiště, řadíme:

- Rod *Salmonella*
- Rod *Escherichia*
- Rod *Enterobacter*
- Rod *Klebsiella*
- Rod *Proteus*

#### 1.6.4.1.1 Rod *Salmonella*

Gram negativní *Enterobacteriaceae* bakterie, způsobují onemocnění jak u lidí, tak zvířat. Nejdůležitějšími zástupci tohoto rodu je *Salmonella enterica* a *Salmonella*

*bongori*. Do těla hostitele proniká z kontaminované potraviny nejčastěji malou tepelnou úpravou, protože tyto bakterie by měla zničit teplota nad 70°C, vajec či masa. Množí se v tenkém střevě a při tom produkují toxické látky, které se následně dostávají do krevního oběhu. Může dojít až k salmonelóзовé sepsi, orgánové infekci či endokarditidě. Onemocnění může probíhat také bez symptomů a to v případě, kdy se tato bakterie usídí ve žlučníku, odtud se však dostane do stolice a může dojít k nákaze dalších jedinců. Jako vhodnou terapii volíme antibiotika např. ampicilin.

#### **1.6.4.1.2 Rod *Escherichia***

Mezi nejběžnější zástupce tohoto rodu řadíme spory netvořící tyčinku *Escherichia coli*, která je ovšem za normálních podmínek součástí běžné střevní mikroflóry člověka a udržuje její rovnovážný stav, syntetizuje zde vitaminy K a B a brání také rozšíření ostatních patogenů. Některé serotypy však mohou vyvolávat onemocnění a to Enteropatogenní – novorozenecké průjmy. Enteroinvazivní – pronikají do střev epitelálních buněk a projevují se zvracením, průjmy a horečkou. Enterohemorragické – tento serotyp vyvolává krvavé průjmy a Enterotoxické – produkují enterotoxiny a způsobují cestovatelské průjmy. Dále také může napadat močové cesty a rány. *Escherichia coli* často způsobuje nozokomiální infekce a je též původcem bakteriémie. Jako léčbu opět volíme nasazení antibiotik.

#### **1.6.4.1.3 Rod *Enterobacter***

Enterobakter je známa jako další opouzdřená a pohyblivá bakterie, která se běžně nachází v lidském střevě. Jejich patogenita je poměrně nízká, ale některé kmeny této bakterie jsou oportunně patogenní a nejčastěji infikují močové a dýchací ústrojí a to hlavně jako nozokomiální nákazy. Někdy ale mohou způsobit i meningitidu a sepsi. Jako známe zástupce tohoto rodu lze uvést například *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter species* či *Enterobacter aerogenes*.

#### **1.6.4.1.4 Rod *Klebsiella***

Jedná se o polysacharidově opouzdřenou nepohybující se tyčku. Tato bakterie se jako součást běžné flóry vyskytuje v trávicím traktu, dutině ústní. Mezi nejčastější zástupce řadíme *Klebsiellu pneumoniae* a *Klebsiellu oxytoca*. Jsou to bakterie, které mohou za určitých podmínek způsobovat infekce jako je pneumonie, uroinfekce a také jako nemocniční nákaza způsobují septický stav a to většinou na odděleních jednotky intenzivní péče. Jsou také hodně rizikové pro novorozence, u kterých je původcem hnisavé meningitidy.

#### **1.6.4.1.5 Rod *Proteus***

Tento rod tvarově rozmanitých bakterií se vyskytuje jako běžná flóra v tlustém střevě. Jeho nejznámějšími zástupci jsou *Proteus mirabilis* a *Proteus vulgaris*. Jeho patogenita se projevuje nevíce při vniku do močových cest, k tomu většinou dochází u delší dobu katetrizovaných pacientů. Kontaminují otevřené rány a mohou způsobovat také záněty středního ucha, většinou u novorozenců dětí a oslabených pacientů. Charakteristický je pro něj plazivý růst. Jsou dobře citlivé k antibiotikům.

#### **1.6.4.2 Rod *Campylobacter***

Tento rod tvoří pohyblivé, mikroaerofilní, gram negativní bakterie v zakřiveném tvaru tyčinek, nebo tyček ve tvaru spirály s bičíkem. Mezi nejčastější členy řadíme *Campylobacter jejuni*, který má schopnost pronikat hlenem střeva. Řadíme ho mezi vážný lidský patogen. Jeho přenos je buďto kontaminovanou potravou, vodou, mlékem nebo přímou cestou přenosu ze člověka na člověka. Jedná se o nejčastějšího původce průjmů bakteriálního původu v České republice, které za normální podmínek do několika dnů zmizí a jediným rizikem může být dehydratace, u dětí však průběh může být velmi těžký.

U oslabených jedinců mohou vyvolávat meningitidy a septická onemocnění. U průjemových onemocnění terapie antibiotiky není nutná a léčba je pouze rehydratací, pokud ale dojde k infekci krevního řečiště, nasazují se antibiotika, jako jsou makrolidy a tetracykliny.

#### **1.6.4.3 Rod *Haemophilus***

Jde o gram negativní, opouzdřené a nepohyblivé tyčky, které netvoří spory. Jejich vztah ke kyslíku je fakultativně anaerobní nebo aerobní. Nejvýznamnějším zástupcem tohoto rodu je *Haemophilus influenzae*, který tvoří polysacharidové pouzdro, dle jehož antigenu rozeznáváme ještě serotypy A – F, nejvíce patogenní je typ B. Patogenní kmeny této bakterie způsobují hnisavé záněty dýchacích cest, zánět spojivek, meningitidy a následně mohou způsobit i sepsi. K přenosu této bakterie dochází kapénkovou cestou a často tyto infekce vznikají jako komplikace chřipky. Dalšími zástupci jsou *Haemophilus parainfluenzae* nebo *Haemophilus ducreyi*. Jako prevence existuje očkovací látka (hexavakcína) a jako vhodnou terapii bereme antibiotika například ampicilin, nebo chloramfenikol.

#### **1.6.4.4 Rod *Pseudomonas***

Aerobní pohyblivé bakterie ve tvaru rovných tyček, které netvoří spory. Nejčastějším patogenem je *Pseudomonas aeruginosa*, ten vyvolává onemocnění většinou u osob se sníženou imunitou a je také významný původce nozokomiálních nákaz, kontaminuje katetry či dýchací přístroje. Vyvolává onemocnění jako je zánět močových cest, dýchacího ústrojí nebo středního ucha a také způsobuje závažné komplikace u popálenin, zde dochází velmi rychle k rozvoji sepse s vysokou mortalitou. Je také velmi nebezpečný pro novorozence, u kterých způsobuje infekce oka a záněty kostní dřeně. K terapii je třeba kombinovat alespoň dvě antibiotické látky (2, 13, 26, 27, 29).

### 1.6.5 Kvasinkoví původci

Jsou to jednobuněčné organismy, které řadíme do třídy hub. Některé kvasinky jsou běžnou částí flóry dutiny ústní, pochvy a střeva. Nejčastějším zástupcem kvasinek je bakterie *Candida albicans*, u lidí se sníženou schopností imunitního systému způsobuje ústní a genitální infekce. Při přemnožení této bakterie nad normu mikrobiální flóry (většinou při používání antibiotik) může dojít ke kandidóze (druh mykózy). U dětí způsobuje nemoc zvanou moučnivka. Při přemnožení se mohou vyskytnout i v krevním řečišti, kde vyvolají sepsi a v genitáliích. Sepse způsobené kvasinkami nejsou příliš časté, značí se však vysokou úmrtností. K nárůstu kvasinkových infekcí dochází zejména u HIV pozitivních pacientů. Jako terapii volíme antimykotika (26, 27)

### 1.7 Výskyt Bakteriálních původců infekcí krevního řečiště

V současné době se ve vyspělých zemích nejčastěji jako původci infekcí krevního řečiště projevují kmeny *Staphylococcus aureus*, koaguláza - negativní stafylokoky a enterokoky. Kmeny koaguláza – negativních stafylokoků způsobují více než třetinu všech infekcí krevního řečiště (36%) dále pak *Staphylococcus aureus* (16%) a enterokoky (13%). Nejčastější jsou však u nedonošených dětí, malých dětí a hematoonkologických pacientů. Gram negativní původci jsou také velmi nebezpečné, značí se tím, že mají častější rozvoj v sepsi, vysokou úmrtnost a možnost vzniku endotoxinové reakce. Gram negativní bakterie většinou rozvíjejí sepsi u pacientů s umělou plicní ventilací a infekcí močových a dýchacích cest. Mezi nejčastější původce patří *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter species*. Jako nejčastější původce katéetrových infekcí jsou brány *Staphylococcus aureus*, kvasinky, enterobakterie a *Pseudomonas aeruginosa*.

### **1.7.1 Infekce krevního řečiště u dětí**

V posledních letech se původ bakteriémie změnil a to hlavně z důvodu očkování proti *Haemophilus influenzae* typu B. Na druhou stranu se bohužel zvýšil výskyt systémových nozokomiálních infekcí. Nejčastějšími patogeny bakteriémie u dětí je *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* a *Escherichia coli*. U novorozenců jde pak o původce *Streptococcus agalactiae*, koagulázanegativní stafylokoky a *Escherichia coli* (7, 14).

## **2 Cíle práce**

Cílem této práce bylo osvojení si laboratorní metodiku automatizovaného vyšetření v Nemocnici České Budějovice a.s. a manuálního vyšetření hemokultur v laboratoři Stafila, jejich následné porovnání a interpretace výsledků.

## 3 Metodika

### 3.1 Preanalytická část vyšetření

#### 3.1.1 Odběr vzorku

Pravděpodobně nejjednodušší fáze vyšetření, obsahuje však nejdůležitější prvky, které ovlivňují celou následnou laboratorní diagnostiku.

Odběr krve provádí buďto lékař nebo sestra většinou při horečkách neznámého původu. Nejdůležitější je aseptický odběr z venepunkčního místa nehledě na arteriální nebo venózní krev. Pokud bych lahvičku kontaminovala, může dojít k falešně pozitivnímu výsledku. Před odběrem jsem také provedla stěr z kůže z místa vpichu, který potom mohu porovnat s výsledkem, jestliže bych měla podezření na falešnou pozitivitu. Odběr se provádí pokud možno co nejdříve po nástupu prvních příznaků a před zahájením antibiotické léčby. Pokud už je léčba antibiotiky zahájena, bylo nutno odběr provést před podáním další dávky antibiotik, což je doba kdy je hladina antibiotik v krvi nejnižší.

Krev jsem nejdříve odebrala do sterilní stříkačky a až poté aplikovala 10 ml do kultivačních lahviček s tekutým kultivačním médiem a to do lahviček Biomerix aerobních a anaerobních, jejich zátka je samozřejmě dezinfikována také (70% izopropylalkoholem). Pro automatické vyšetření v Nemocnici České Budějovice a.s. a také do lahvičky Oxoid signal pro vyšetření hemokultury v laboratoři Stafila. Pokud bych měla vakuovou soupravu, lze odběr provést přímo do hemokultivační lahvičky, bez prvotního použití injekční stříkačky. U dospělých jsem odebírala 2 lahvičky BioMérieux a celkový objem odebrané krve je 10 ml. U novorozenců se odebírá 1-2 ml krve a u dětí do 13-ti let 3-5 ml krve do pediatrické lahvičky. U lahviček Oxoid signal odebíráme krev pouze pro jednu kultivační lahvičku a to 5 ml.



### **3.1.2 Transport vzorku**

Po tom co jsem odebranou krev aplikovala do lahviček je nutný rychlý transport lahviček do laboratoře a s ním i stěr z kůže z místa vpichu, musí být v co nejmenší časové prodlevě po odběru, protože k pomnožování bakterií dochází ihned po smíchání krve s médiem v lahvičce. Pokud se transport z nějakého důvodu zpozdí, měly by lahvičky zůstat při pokojové teplotě (15 – 25°C), nikoli dány do ledničky. Vzhledem k tomu, že jsem 70% vzorků sama odebírala, byla tato podmínka splněna. Po doručení do laboratoře a vložením do inkubátorů jsem zkontrolovala lahvičky, když vykazovaly známky růstu, ihned jsem jejich obsah vyočkovala na půdy. Každá lahvička také musí obsahovat svou průvodku. Ta obsahuje všechny údaje pacienta i jeho lékaře, požadavky na vyšetření, klinické údaje a také velmi důležité datum a čas odběru. Lahvička s krví musí být označena jménem pacienta, jeho rodným číslem a zasílatelem. Průvodka se vzorkem se samozřejmě musí shodovat.

## **3.2 Analytická část vyšetření**

### **3.2.1 Automatizované zpracování přístrojem BacT/ALERT 3D**

Lahvičky s krví jsem pouze vložila do otvorů v přístroji BacT/ALERT. Ten sám do druhého dne rozpoznal pozitivní lahvičky a signalizoval je. Negativní lahvičky se v přístroji kultivovaly po dobu 7 dnů a poté byly zlikvidovány.

Obsah lahviček přijatých v nemocnici je očkovan na půdy podle toho, o jaké lahvičky se jedná. Modrá, zelená a žlutá lahvička jsou očkovány na Endovu půdu a krevní agar, který je dán do CO<sub>2</sub>. Fialová a oranžová lahvička jsou očkovány na Endovu půdu, krevní agar a navíc na Schaedlerovu půdu. Ve všech pozitivních případech je ještě udělán mikroskopický preparát a vstříknutí materiálu do pomnožovacího bujónu.

### **3.2.1.1 Přípravení mikroskopického preparátu:**

Z pozitivní hemokultivační lahvičky je třeba pro přímý průkaz bakterií provést mikroskopický preparát, který umožňuje rozlišit bakterie dle typu buněčné stěny

S hemokulturou jsem pracovala jako s infekčním materiálem, takže jsem její zpracování prováděla v laminárním (odsávacím) boxu s ochrannými pomůckami. Nejdříve jsem víčko lahvičky vydezinfikovala 70% izopropylalkoholem a počkala do zaschnutí. Připravila jsem si čisté mikroskopické sklíčko, které jsem si nadepsala číslem lahvičky. Následně jsem pro odvzdušnění hemokultury propíchlá gumové víčko jehlou a počkala na únik plynu. Po odvzdušnění jsem nasadila na jehlu injekční stříkačku a poté lahvičku s injekcí pomalu otočila tak, aby konec jehly byl ponořen v kapalině. Pak jsem trochu tekutiny odsála a kápala jednu kapku na připravené sklíčko a sterilní kličkou provedla jemný nátěr. Sklíčko s nátěrem jsem nechala zaschnout a poté zafixovala teplem (protáhla jsem sklíčko několikrát nad plamenem) pro usmrcení a přichycení bakterií bez toho, aby došlo k jejich poškození. Zafixované sklíčko jsem poté musela pro mikroskopické rozlišení G+ a G- bakterií obarvit dle Grama.

#### **3.2.1.1.1 Barvení dle Grama:**

- 1) Preparát jsem přelila Krystalovou violetí a nechala 20 sekund působit. Krystalová violet je kyselé barvivo, mělo by se tedy navázat na kyselé skupiny bakterií.
- 2) Preparát s violetí jsem slila Lugolovým roztokem a nechala ho dále působit po 20 sekund. Jód z roztoku se pojí s barvivem a vytvoří precipitát.
- 3) Preparát jsem následně odbarvila acetonem a poté opláchla vodou. Aceton prostoupí buněčnou stěnou G- bakterií a rozpustí a vyplaví precipitát z předešlého barvení. U bakterií G+ prostupuje aceton ztelně pomaleji. G+ bakterie tedy zůstanou na rozdíl od G- obarvené.

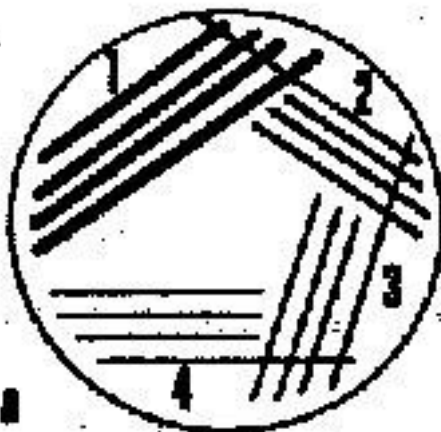
- 4) Omytý preparát jsem následně obarvila 30 – 60 sekund Karbofuchsinem. Toto dobarvení dodá G+ bakteriím modrofialovou barvu. U G- bakterií se acetonem odbarvené bakterie dobarví Karbofuchsinem do červena.
- 5) Nakonec jsem preparát ještě opláchla vodou a osušila.
- 6) Zhotovený preparát prohlíží lékař pod objektivem s imerzí. Nález se ihned hlásí ošetřujícímu lékaři.

V Nemocnici České Budějovice a.s. je k barvení používán přístroj automatický. Barvení dle Grama nám pomáhá určit další postup vyšetřování.

### **3.2.1.2 Rozočkování vzorku na pomnožovací půdy po vyjmutí z přístroje BacT/ALERT**

Pro rozočkování krve jsem si nejdříve popsala plotny, které jsem potřebovala stejným číslem jako má hemokultivační lahvička. Pro rozočkování krve na pevné půdy jsem použila krev z injekční stříkačky, kterou jsem nabrala již při zhotovování mikroskopického preparátu. Z injekční stříkačky jsem tentokrát kápala krev na již připravené a nadepsané pomnožovací půdy. Poté jsem jehlu vyhodila do odpadního kontejneru určeného pro ostré předměty.

Z aplikované kapky jsem pak sterilní bakteriologickou kličkou rychlými rovnoběžnými pohyby udělala inokulum přibližně do jedné třetiny pevné půdy. Bakteriologickou kličku jsem potom vyměnila, nebo vyžihala a táhla další jednu až dvě čáry kolmo z inokula téměř ke kraji misky, pod vedenou čáru jsem udělala ještě pár čar přibližně do třetiny půdy, tak aby už se inokula nedotýkaly. Otočila jsem si kličku a přes již vyočkované čáry vedla další čáru a pod ní další tak, aby se již nedotýkaly tahů vedených z inokula. Následně jsem si opět vzala sterilní bakteriologickou kličku a tento postup opakovala ještě jednou. Tímto způsobem očkování bych měla snadno dosáhnout jednotlivých kolonií.



Obr. 4 –rozočkování-Pod číslem 1 je znázorněno inokulum.

### 3.2.2 Manuální zpracování hemokultur

Krev jsem odebírala do hemokultivačních lahviček Oxoid Signal s kultivačním médiem. Lahvičku jsem promíchala a vydezinfikovala její zátku. Poté jsem ze sterilního obalu vyjmula signální systém, ujistila se, že je pevně spojen a odstranila z jehly kryt. Následně jsem na lahvičku asepticky signální systém nasadila a to tak, že jsem jehlu protlačila zátkou nejdále, jak to jde. Poté jsem zasunula zelenou manžetu indikátoru růstu, než úplně uzavřela víčko lahvičky. Lahvičku se signálním systémem jsem poté vložila do termostatu a několikrát za den protřepala a prohlížela. Pokud jsem shledala lahvičku pozitivní, ihned jsem její obsah vyočkovala na kultivační půdy krevní agar, Schaedlerův agar a sklíčko na mikroskopii. Lahvičky, co nebyly hodnoceny, jako pozitivní jsem nechala 7 dní při 37 °C kultivovat v termostatu a občas je rázně protřepala. Pozitivitu rozeznám dle vystoupení kapaliny do indikátoru.

### **3.2.2.1 Rozočkování vzorku na pomnožovací půdy po manuálním vyšetření:**

Pokud je v nasazeném aplikátoru na hemokultivační lahvičce nasátá tekutina, znamená to, že je hemokultura pozitivní. Je tedy třeba ji opět dále zpracovávat. Opět jsem pracovala v laminárním boxu. Rozdíl je v tom, že jsem tekutinu nemusela nasávat do injekční stříkačky, jelikož je již vystoupaná v aplikátoru, tudíž k ní po otevření máme volný přístup. Odšroubovala jsem tedy víčko a do kapaliny ponořila deseti mikrolitrovou kličku, tak aby v otvoru byla kapalina. Touto kličkou jsem udělala inokulum a rozočkovala pěti mikrolitrovou kličkou na krevní a Schaedlerův agar stejným postupem, jaký byl uveden u automatizovaného zpracování.

### **3.2.3 Negativní hemokultury**

Pokud jsem po 7 dnech lahvičku nevyhodnotila jako pozitivní, brala jsem ji jako negativní a výsledek jsme zaznamenali do LIS. Materiál jsem dále nezpracovávala a lahvičku jsem vyhodila do kontejneru pro infekční odpad. Zprávu o negativitě jsme zaslali lékaři.

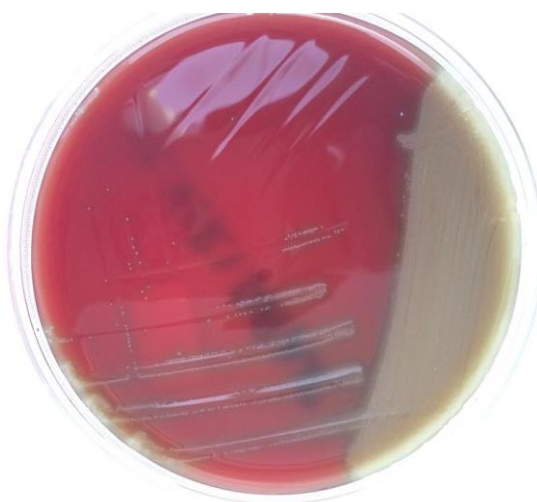
### **3.2.4 Dourčování druhu bakterie z pozitivních vzorků**

U pozitivních hemokultur je třeba pro stanovení bakteriálního patogenu provést další do určující vyšetření. Proto jsem po kultivaci a mikroskopii z manuální pozitivní hemokultury prováděla řadu dalších testů a to vždy podle podezření na bakterii, které jsem získala z nálezu v mikroskopickém preparátu a vzhledu kolonií narostlých na půdě.

## 4 Výsledky

### 4.1 První pozitivní hemokultura

V první pozitivní hemokultuře jsem na mikroskopickém preparátu po barvení dle Grama našla gram pozitivní koky v řetízích. Na Schaedlerově půdě a krevním agaru byly narostlé drobné kolonie žlutozelené barvy. Usoudili jsme tedy, že se bude jednat o bakterie rodu *Streptococcus*. Aby se náš úsudek potvrdil a mohla jsem určit, o jaký druh streptokoka se jedná, bylo třeba provést další doručující testy.



Obr. 5 – nárůst kolonií na krevním agaru

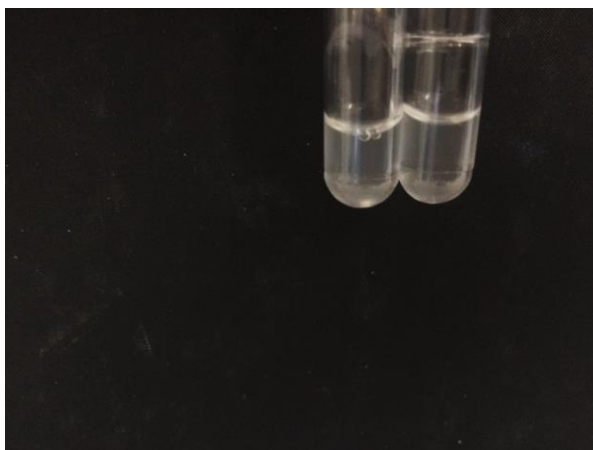
#### 4.1.1 Test rozpustnosti ve žluči

Test je určený k rychlému rozlišení *Streptococcus pneumoniae* a viridujících streptokoků. Tento test stojí na principu rozpustnosti kolonií *Streptococcus pneumoniae* v deoxycholátu sodném, viridující streptokoky se při působení deoxycholátu sodného nijak nepozmění.

Tento test jsem prováděla tak, že jsem do dvou nadepsaných zkumavek dala 0,5 ml fyziologického roztoku. Sterilní kličkou jsem nabrala narostlé kolonie a vyklepala kličku do zkumavek s fyziologickým roztokem tak, aby zákal ve zkumavkách byl 1,5

McFarlanda. Jednu zkumavku jsem zakapala 3 kapkami deoxycholátu sodného, druhou zkumavku jsem nadepsala jako kontrolní a deoxycholát sodný jsem nepřidávala. Obě zkumavky jsem poté vložila do termostatu a inkubovala na 30 minut při 37°C.

Po uběhlých 30-ti minutách jsem zkumavky vyjmula a zkontrolovala zákal. U obou zkumavek jak u vzorku, tak u kontroly jsem nezpozorovala vyjasnění zákalu. Vyloučila jsem tedy, že by se jednalo o pneumokoka.

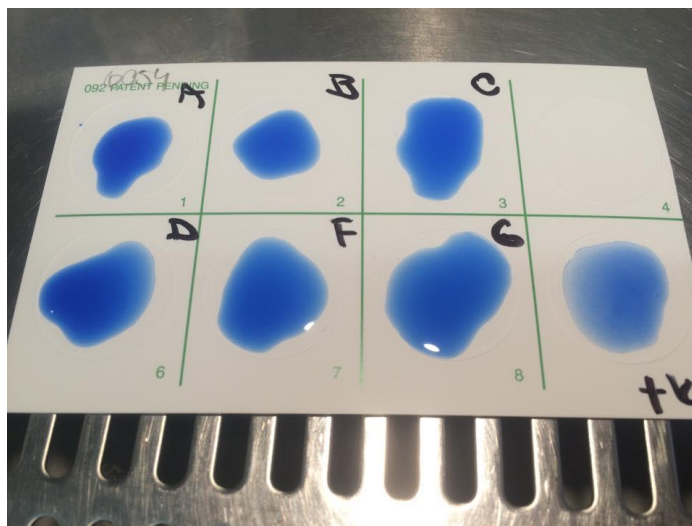


Obr. 6 – negativní test rozpustnosti ve žluči

#### 4.1.2 Test Latex aglutinací

Jako první jsem si popsala zkumavku na smíchání reagensů se vzorkem a také testovací kartičku. Do zkumavky jsem kápala 1 kapku reagensie č. 1. Poté jsem mikrolitrovou kličkou nabrala z půdy kolonie a vyklepala je do zkumavky s kapkou. Poté jsem do této zkumavky nakapala opět jednu kapku, tentokrát reagensie č. 2. Zkumavku jsem proklepala a přidala do ní ještě 5 kapek reagensie č. 3. Zkumavku jsem opět proklepala a poté jsem kapátkem nanasla jednu kapku této suspenze do kruhu na testovací kartičce, celkem jsem kapala do šesti kruhů. Vedle kapky suspenze jsem ještě kápala jednu kapku latexové suspenze, celkem 6 druhů (A, B, C, D, F, G ). Do sedmého kruhu jsem smíchala kontrolní vzorek ze setu s kapkou latexové suspenze pro kontrolu. Poté vždy novou sterilní tyčinkou, která je součástí setu, smíchala tyto dvě kapky. Následně jsem

testovací kartičku krouživými pohyby nakláněla, aby se směs přelávala a mohlo dojít ke vzniku aglutinace. Po minutě jsem pak odečítala výsledek. Náš vzorek aglutinaci netvořil.

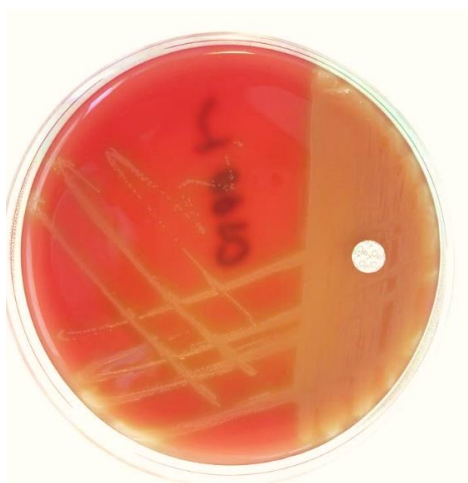


Obr. 7 – testovací kartička, aglutinace negativní. Kontrola s jemnou aglutinací.

#### 4.1.3 Optochinový test

Tento test opět slouží k rozlišení *S. pneumoniae* od viridujících streptokoků. Při tomto testu jsem sterilní kličkou nabrala kolonie narostlé bakterie a jsem naočkovala na krevní agar obvyklým způsobem. Do středu inokula jsem následně položila disk optochinu a dala inkubovat do druhého dne při 37 °C. Pokud by se jednalo o pneumokoka, byla by kolem optochinu zóna inhibice. *S. Pneumoniae* je totiž na optochin citlivý, tudíž kolem disku bakterie nerostou. V našem případě byly bakterie k optochinu rezistentní, tudíž jsme pneumokoka vyloučili.





Obr. 8 – optochin rezistentní

#### 4.1.4 Citlivost na antibiotika

Dalším krokem bylo stanovení citlivosti na antibiotika. Stanovovala jsem citlivost na pneumokoka a ostatní streptokoky na Muller-Hinton agaru s příměsí krve pomocí difuzního diskového testu. Tento test jsem prováděla tak, že jsem si kličkou nabrala vyrostlé kolonie bakterií a vytřepala do fyziologického roztoku, aby zákal byl 0,5 McFarlanda. Tento roztok jsem rozlila do připravené popsané plotny s agarem, tak aby se roztok dostal na všechna místa, a zbytek jsem vylila do infekčního odpadu. Poté jsem na naočkovanou plotnu narazila pomocí raznic antibiotikové disky a do druhého dne dala kultivovat při 37°C víčkem dolů. Po inkubaci se změří průměr inhibičních zón a podle velikosti se určí, zda je kmen bakterie k určitým antibiotikům citlivý nebo rezistentní



Obr. 9 – citlivost na antibiotika

#### 4.1.5 E-test

Dalším testem byl E-test, tento test slouží ke stanovení minimální inhibiční koncentrace. Test jsem prováděla stejně jako u diskového testu až po rozlití roztoku na plotnu. V této fázi jsem místo naražení disků položila doprostřed plotny pinzetou proužek se stupnicí, který je napuštěný stoupající koncentrací penicilinu a dala ho inkubovat na 37 °C do druhého dne. Při provedení tohoto testu vyšla MIC 2.

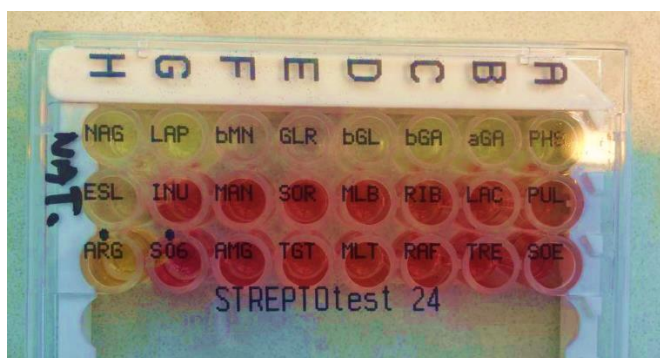


Obr. 10 – E-test - MIC 2

#### 4.1.6 STREPTOtest 24

Tento test je určen pro definitivní identifikaci rodu *Streptococcus* a *Enterococcus*. Je to destička s 24 jamkami (značené od 1-3 a H-A) a každá nese jiný biochemický znak. Kazetu s jamkami jsem popsala a další krok tohoto testu jsem prováděla tak, že jsem si připravila suspenzi z 3 ml fyziologického roztoku a narostlé kultury, aby byl zákal 2-2,2 McFarlanda. Poté jsem vzala mikrolitrovou pipetu a aplikovala jsem 100 mikrolitrů tohoto roztoku do prvních řady svislých a první řady podélných jamek (řada 1 a řada H). Poté jsem pipetou přenesla 1,5 ml z tohoto roztoku do suspenzního media, které je součástí sady STREPTOtest. Tento roztok s mediem jsem následně aplikovala do zbylých jamek (řady G-A + 2 a 3). Nakonec jsem ještě jamky značené černým puntíkem, v tomto případě jamky 3H a 3G zakapala parafinovým olejem. Víčko na přikrytí destičky jsem před přikrytím ještě vydesinfikovala a destičku jsem vložila do sáčku ze sady a jeho konec vložila pod ní, poté jsem dala sáček s destičkou inkubovat do druhého dne při 37 °C. Výsledek jsem zaznamenala do formuláře a odečítala zbarvení podle barevné srovnávací stupnice.

Výsledek první pozitivní hemokultury jsme podle výsledků všech provedených testů zhodnotili, jako že se jedná o viridující streptokoky. Tento nález jsme našli u dvou pozitivních hemokultur.



Obr. 11 - STREPTOtest 24

#### 4.1.7 Tabulka zhodnocení výsledků

provedený test	Výsledek testu
mikroskopie	G+ koky v řetězcích
test rozpustnosti ve žluči	negativní
optochinový test	negativní
E - test	MIC 2
STREPTOtest 24	viridující streptokoky
<b>výsledek</b>	<b>viridující streptokoky</b>

#### 4.2 Druhá pozitivní hemokultura

Při druhém pozitivním nálezu jsme zjistili, že se jedná o gram pozitivní koky v shlucích, kolonie byly hladké a žlutavé barvy. Usoudili jsme, že by se mohlo jednat o rod *Staphylococcus* a museli jsme toto domnění prokázat. Prováděli jsme opět řadu testů.



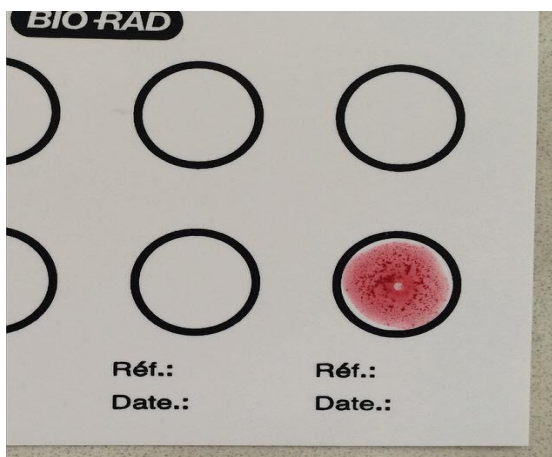
Obr. 12 *Staphylococcus aureus*

#### 4.2.1 Test hyaluronidasa

Tento test odliší *Stafylokoka aurea* od ostatních kmenů rodu *Staphylococcus*. Metodu jsem prováděla tak, že jsem na krevní agar udělala tlustou čáru streptokoka equi a kolmo ta tuto čáru jsem vedla další čáku vykultivované bakterie. V případě, že se jedná o *S. aureus*, udělá se kolem začátku vedené čáry půlkruhová zóna. Náš test vyšel pozitivní.

#### 4.2.2 Test Koagulace

Jako další jsem prováděla test koagulace plazmy, stojí na smíchání kolonii s králičí plasmou, pokud dojde ke koagulaci, jedná se o stafylokoky koagulázapozitivní. Tento test jsem prováděla tak, že jsem si na kartičku z připraveného setu dala kapku roztoku, který již byl připravený v lahvičce. Poté jsem si sterilní kličkou nabrala narostlou kolonii, kterou jsem v kapce rozmíchala. Okamžitě jsem zpozorovala aglutinaci. Zjistila jsem tedy, že se jedná o stafylokoka koagulázapozitivního.



Obr. 13 – vpravo dole můžeme vidět vzniklou aglutinaci

### 4.2.3 Test citlivosti

Dále jsem prováděla diskový difúzní test na citlivost antibiotik. Postup byl naprosto totožný jako u provádění první citlivosti. Rozdíl byl jen v tom, že jsem použila Miller-Hinton agar bez příměsi krve. U *S. aurea* se ještě provádí test, zda se nejedná o kmen MRSA. Tento test se provádí vyočkováním kolonie na půdu MRSA select, na které roste pouze tento kmen. Dále se dělá citlivost na další řadu antibiotik.



Obr. 14 - citlivost

### 4.2.4 STAPHYtest 24

Souprava tohoto testu slouží k definitivní identifikaci rodu *Staphylococcus*. Jedná se opět o kazetu s 24 jamkami. Destičku s jamkami jsem si opět nejdříve popsala. Poté jsem si udělala suspenzi z fyziologického roztoku a čisté kultury o zákalu 2 McFarlanda. Poté jsem vzala pipetu a do každé jamky napipetovala 100 mikrolitrů suspenze. K jamkám H, G a F v prvním řádku destičky jsem ještě nakapala 2 kapky parafinového oleje. Poté jsem vydesinfikovala víčko destičky a vložila jsem napipetovanou destičku do sáčku a konec opět zahrnula pod destičku, aby nedošlo k vyschnutí. Destičku jsem následně vložila do termostatu a inkubovala při 37 °C do druhého dne. Výsledek jsem poté hodnotila podle barevné srovnávací stupnice, jako že se jedná o stafylokoka aurea.



Obr.15 – výsledek STAPHYtestu 24

#### 4.2.5 Tabulka zhodnocení výsledků

provedený test	výsledek testu
mikroskopie	G+ koky v hloučkách
test hyaluronidázy	pozitivní
Koagulace plazmy	pozitivní
STAPHYtest 24	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>výsledek</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>

### 4.3 MALDI –TOF

V Nemocnici České Budějovice a.s. se dourčení druhu bakterie neprovádí manuálně, nýbrž metodou MALDI- TOF (MALDI -ionizace laserem za přítomnosti matrice, TOF – analýza doby letu). Přístroj VITEK MS, která tuto metodu provádí, umožňuje rychlou diagnostiku bakterií na základě hmotnostní spektrofotometrie. V přístroji na vzorek působí laserový paprsek a vzorek spolu s matricí se odpaří za vzniku elektrického náboje. Poté dojde k rozdělení iontů ve vakuové trubici podle hmotnosti a doby letu. Výsledek je prezentován ve formě píků, které jsou obrazem úseků molekul ve vzorku. Spektra jsou následně srovnávána v databázi a jsou navrženy druhy bakterií, kterými může vzorek být a také procentuální pravděpodobnost.

Malé množství Izolované bakterie z půdy jsem nanesla 1 mikrolitrovou kličkou na terčík testovací destičky, která obsahuje 48 terčků. Nanesenou vrstvičku na terčíku jsem zakapala 1 mikrolitrem matričního roztoku, který urychluje ionizaci bílkovin, rozetřela a nechala zaschnout, poté jsem celou destičku vložila do přístroje VITEK MS, který pomocí svého softwaru bakterii identifikoval.

Rozeznání *Streptococcus pneumoniae* od viridujících streptokoků je však na tomto přístroji obtížné. Musela jsem tedy kmen dourčit stejnými manuálními metodami jaké jsem prováděla v laboratoři Stafila. Zlatého stafylokoka přístroj určil bez potíží.



Obr. 7 – destička na MALDI-TOF    Obr. 8. Přístroj VITEK MS



#### 4.4 Nález pozitivity

V laboratoři Stafila i v bakteriologické laboratoři Nemocnice České Budějovice a.s. jsem provedla vyšetření 20 hemokultur, z nichž 4 byly vyhodnoceny jako pozitivní, což odpovídá 20 % pozitivity. Krev pro vyšetření byla odebírána v pediatrické ordinaci a následně transportována do již zmíněných laboratoří. Po dobu mé práce v těchto laboratořích jsem se zaměřila na odlišnosti analytického zpracování.

Tabulka s výsledky vzorků

<b>vzorky</b>	<b>Nemocnice Č.B. a.s.</b>	<b>Laboratoř Stafila</b>
1	negativní	negativní
2	negativní	negativní
3	negativní	negativní
4	negativní	negativní
5	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
6	negativní	negativní
7	negativní	negativní
8	viridující streptokoky	viridující streptokoky
9	negativní	negativní
10	negativní	negativní
11	negativní	negativní
12	viridující streptokoky	viridující streptokoky
13	negativní	negativní
14	negativní	negativní
15	negativní	negativní
16	negativní	negativní
17	negativní	negativní
18	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
19	negativní	negativní
20	negativní	negativní

#### 4.4.1 Diagnózy pacientů, kterým byla hemokultura odebrána

- 1) Kolísající vysoké teploty
- 2) Třídenní zvýšené teploty se zvýšenou sedimentací a leukocytózou
- 3) Zvýšené teploty neznámého původu, leukocytóza posunuta doleva
- 4) Čtyřdenní zvýšené teploty kolísavého charakteru, pacient nereagoval na penicilin
- 5) Urosepse
- 6) Septické teploty s průkazem pneumonie
- 7) Zvýšené septické teploty, leukocytóza a meningeální příznaky
- 8) Zvýšené teploty, leukocytóza, zvracení
- 9) Infekce močových cest, akutní pyelonefritida
- 10) Infekce močových cest se septickým průběhem
- 11) Pětidenní teploty, leukocytóza doleva
- 12) Opakované teploty v průběhu tří měsíců. Zvýšená sedimentace a leukocytóza
- 13) Zvýšené teploty septického charakteru, leukocytóza
- 14) Infekce močových cest se septickým průběhem
- 15) Těžká angína spojená s leukocytózou a zvýšenou sedimentací
- 16) Infekce močových cest s teplotami septického původu
- 17) Zvýšené teploty septického charakteru, leukocytóza doleva. Nereagoval na antibiotika.
- 18) Flegmóna dolních končetin, zvýšené teploty a leukocytóza
- 19) Čtyřdenní septické teploty nejasné etiologie, leukocytóza
- 20) Angina provázena septickými teplotami, leukocytóza, nereagoval na antibiotika

U obou dvou laboratorních pracovišť jak u laboratoře Stafila, tak u bakteriologické laboratoře Nemocnice České Budějovice a.s. byly zjištěny stejné výsledky. Tedy dvojí nález viridujících streptokoků a jednou byl nalezen *Staphylococcus aureus*.

## 5 Diskuze

Pro účel mé bakalářské práce bylo zpracováno 20 vzorků na dvou různých pracovištích. Krev na hemokultivační vyšetření byla odebírána od dětí z terénu z ambulantního vyšetření. Jelikož jsme objevili i pozitivní nálezy, je vidět že i v terénu je hemokultivační vyšetření důležité. Dvakrát jsem našla viridující streptokoky, které však mohou být brány jako kontaminace, je tedy třeba přihlížet ke klinickému stavu. Jednou byla nalezena *Escherichia Coli*. Jednou byl nalezen *Staphylococcus aureus*. Odborná literatura (4, 15) tvrdí, že až z jedné třetiny způsobují bakteriální infekci krevního řečiště koaguláza-negativní stafylokoky a *Staphylococcus aureus*. Zatímco viridující streptokoky způsobují infekci krevního řečiště jen z 2%. Kontaminace pozitivních nálezů však byla nepravděpodobná, vzhledem k negativním výsledkům stěrů. I při jasných klinických známkách sepse se jí však vždy nepodaří v hemokultuře prokázat. O čemž jsme se přesvědčili i v našem výzkumu. Procento pozitivity z jednorázových odběrů při mém zpracování činilo 20% (7, 9, 14, 15).

### 5.1 Porovnání zpracování mikrobiologických laboratoří Stafila a Nemocnice České Budějovice a.s.

V tabulce se vám pokusím přiblížit rozdíly laboratoří ve zpracování přijaté krve v hemokultivačních lahvičkách. Je také třeba zmínit, že obě laboratoře jsou plně vybaveny pro zpracování hemokultivačního vyšetření.

Tabulka – Rozdíly laboratoří

<b>Rozdíl</b>	<b>Nemocnice České Budějovice a.s.</b>	<b>Laboratoř Stafila</b>
<b>Hemokultivační lahvičky</b>	<p>V laboratoři nemocnice používají pro zpracování hemokultur 5 odlišných druhů lahviček, které se od sebe liší barvou zátky, krev se odebírá vždy po páru lahviček (Modrou – fialová, zelená – oranžová), který se skládá z lahvičky na aerobní a anaerobní kultivaci a dále se tento pár volí dle toho, jestli pacientovi již byla podána antibiotika či nikoli. Pátá žlutá lahvička je pediatrická, do které se odebírá krev malých dětí a do které je možno odebrat menší množství krve.</p>	<p>V laboratoři Stafila používají pro hemokultivaci pouze jednu lahvičku značky Oxoid signal, do které jsou odebírány všechny krve od pacientů, protože její medium je vhodné pro pomnožení všech bakterií</p>
<b>Hodnocení lahviček</b>	<p>V bakteriologické laboratoři Nemocnice České Budějovice a.s. se o kultivaci lahviček stará přístroj Bact/ALETR, do kterého jsou lahvičky vloženy a který případnou pozitivitu okamžitě detekuje a tento nález ohlásí.</p>	<p>V laboratoři Stafila se lahvičky Oxoid signal kultivují při 37 °C v termostatu a je třeba je pravidelně promíchávat. Pozitivitu lahvičky rozpozná laborant a to dle vzlínání tekutiny do signální nádoby.</p>

<p><b>Barvení preparátu</b></p>	<p>K obarvení preparátu je používán stroj, do kterého se vloží ofixované preparáty a zvolí se mód barvení. Příklad preparáty barví pomocí madla, které přesouvá preparáty z jedné chemikálie do druhé. Po uplynutém čase jsou preparáty vnořeny a přístroj signalizuje konec procesu</p>	<p>V laboratoři Stafila se barví nátěr manuálně, to znamená, že postup barvení provádí sám laborant, který je za výsledek nabarvení zodpovědný.</p>
<p><b>Půdy pro kultivaci</b></p>	<p>Z anaerobních lahviček (modrá a zelená) a pediatrické lahvičky je materiál očkovan na Endovu půdu a krevní agar do CO<sub>2</sub>. Z lahviček pro anaerobní kultivaci se krev navíc aplikuje na Schaedlerův agar. V nemocnici se navíc materiál aplikuje do pomnožovacího bujónu</p>	<p>Při pozitivě krev rozočkována na krevní a Schaedlerův agar.</p>
<p><b>Kultivace půd</b></p>	<p>V termostatu se zvýšenou tenzí CO<sub>2</sub>, a anaerobní termostat.</p>	<p>Pro vyvinutí atmosféry se zvýšenou tenzí CO<sub>2</sub> používá CO<sub>2</sub> vyvíječ, který se vkládá do sáčku s půdou, to samé s anaerobním vyvíječem.</p>
<p><b>Dourčení druhu bakterie</b></p>	<p>Dochází k dourčování druhu bakterie pomocí metody MALDI – TOF na přístroji VITEK MS.</p>	<p>dourčuje druh bakterie mnoha manuálními testy, jako je optochinový test, test deoxycholátem sodným, sady testů mikrotitračních destiček,</p>

		latex aglutinace atd. Na základě výsledků těchto testů se postupně propracujeme ke konečné diagnostice.
<b>Akreditace</b>	Nemocnice České Budějovice a.s. má akreditovanou mikrobiologickou laboratoř, tudíž postupuje dle svého standardního operačního postupu.	Laboratoř Stafila zatím není akreditovanou laboratoř, pracuje dle národních standardních vyšetřovacích postupů. O akreditaci však bude v nejbližší době usilovat.

Při vyšetření 20 stejných vzorků na dvou různých pracovištích jsem nakonec dospěla ke stejným výsledkům. Za dobu vyšetřování bylo jasně viděno, že v Nemocnice České Budějovice a.s. záleží hlavně na rychlosti zpracování vzorku, proto je diagnostika patogena z hemokultury postavena především na počítačové technice, abychom mohli co nejrychleji přesně určit patogena, který infekci způsobuje. Zatímco v laboratoři Stafila je vyšetření založeno na metodách, které provádí laborant sám. Z hlediska složení pacientů jsou tyto postupy zcela pochopitelné. Hemokultury v Nemocnice České Budějovice a.s. jsou většinou od pacientů, které jsou ve vážnějším stavu a jsou ohroženy na životě, je tedy důležité rychle diagnostikovat mikroba, aby mohla být nasazena léčba. Navíc sepe nozokomiálního původu jsou dle odborné literatury (7) v České republice nejčastější. Na druhou stranu hemokultury v laboratoři Stafila jsou zasílány od praktických lékařů, ke kterým nechodí pacienti s tak vážným stavem, aby při vyšetření muset být kladen důraz na rychlost.

Při vyšetřování oběma způsoby mi bylo umožněno posoudit a srovnat náročnost. Z mého pohledu bylo zpracování hemokultur v Nemocnice České Budějovice a.s. pro laboratorního pracovníka snazší. A to hlavně díky technice MALDI-TOF, která šetří mnoho času při dourčování původce a přístroji BacT/ALERT, který vyhodnocuje pozitivní nález. Laborant se tedy musí plně spolehnout na přístroje, které diagnostiku

ulehčují, na druhou stranu se tím zbavuje části zodpovědnosti. Je také potřeba naučit se tyto přístroje ovládat a rozumět počítačovým výsledkům, které je poté třeba správně posoudit. V laboratoři Stafila provádí laborant celý postup ručně, je tedy plně zodpovědný za jeho správné provedení a následné vyhodnocení výsledku. Jako výhodu manuálního zpracování jsem já osobně shledala, že můžeme vidět, jak určité bakterie reagují, vidíme jejich vlastnosti a práce nespočívá pouze v obsluze přístrojů.

Na kvalitu výsledku ovšem rozdílný postup neměl vliv. Oběma metodami jsem dospěla ke stejným výsledkům

## 6 Závěr

Infekce krevního řečiště je velmi závažné onemocnění a jeho diagnostika patří mezi nejdůležitější mikrobiologická vyšetření. Cílem této bakalářské práce bylo seznámení se s infekcí krevního řečiště, jejími základními pojmy a nejčastějšími patogeny, které infekci způsobují a zpracovat rešerši na toto téma. Dalším cílem bylo zpracování vzorků hemokultur ve dvou laboratořích a to laboratoři Stafila a bakteriologické laboratoři Nemocnice České Budějovice a.s., které pracují při vyšetřování hemokultur odlišnými metodami a to manuální a automatizovanou a obě tyto metodiky si osvojit.

V obou dvou laboratořích jsem došla ke stejným výsledkům a to 16 negativním a 4 pozitivním hemokulturám, je tedy patrné, že obě tyto metody jsou spolehlivé a je možné s nimi bez problému diagnostikovat patogeny způsobující infekci. V praktické části popisují metody vyšetřování a jejich následné porovnání. Dle mého názoru je pro praxi výhodnější automatizované vyšetření hemokultur, je rychlejší, ale nedokáže s přesností určit všechny patogeny. V tomto případě ale lze přejít k metodám manuálním.



## 7 Seznam použité literatury

1. BacT/ALERT® 3D Range. BioMérieux [online]. 2015, Dostupné z: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/bact-alert-3d-microbial-detection-systems-overview>
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, c2009, xxv, 651 s. ISBN 9788072626441.
4. bioMérieux S.A. VITEK MS™ - postup návod k použití, 2011
5. BioVentor - Prolex™ – *Sreptococcal grouping latex kid* – Příbalový leták 2014
6. COMSTEDT, Pål, Merete STORGAARD a Annmarie T LASSEN. The Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) in acutely hospitalised medical patients: a cohort study. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. 2009, vol. 17, issue 1, s. 67-. DOI: 10.1186/1471-2334-11-139. Dostupné z: <http://www.sjtrem.com/content/17/1/67>
7. ČERMÁK, Pavel. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. 1. vyd. Praha: MAXDORF-JESSENIUS, 2008, 182 s. ISBN 9788073451424.
8. DASTYCH, Milan a Petr BREINEK. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2008, 232 s. ISBN 978-80-210-4572-9.
9. DE JONG, Hanna Katrien, Tom VAN DER POLL, Willem Joost WIERSINGA, A. LUSKY a B. REICHMAN. The Systemic Pro-Inflammatory Response in

Sepsis: A National Survey. *Journal of Innate Immunity*. Editor Václav Hrubý. 2010, vol. 2, issue 5, s. 422-430. DOI: 10.1159/000316286. Dostupné z: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000316286>

10. FELTEN, A., B. GRANDRY, P. H. LAGRANGE a I. CASIN. Evaluation of Three Techniques for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a Disk Diffusion Method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-Screen Latex Agglutination Test. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002-08-01, vol. 40, issue 8, s. 2766-2771. DOI: 10.1128/JCM.40.8.2766-2771.2002. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.40.8.2766-2771.2002>
11. HORANOVÁ, Veronika. *Úvod do základů hygieny, epidemiologie, mikrobiologie a imunologie v bodech*. 1. upr. vyd. České Budějovice: Vlastimil Johanus, 2013, 112 s. ISBN 978-80-87510-27-8.
12. HORVATH, L. L., B. J. GEORGE, C. K. MURRAY, L. S. HARRISON a D. R. HOSPENTHAL. Direct Comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D Automated Blood Culture Systems for *Candida* Growth Detection: A National Survey. *Journal of Clinical Microbiology*. Editor Václav Hrubý. 2004-01-08, vol. 42, issue 1, s. 115-118. DOI: 10.1128/JCM.42.1.115-118.2004. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.42.1.115-118.2004>
13. JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006, 404 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 8024612704.
14. MAKHOUL, I. R., P. SUJOV, T. SMOLKIN, A. LUSKY a B. REICHMAN. Pathogen-Specific Early Mortality in Very Low Birth Weight Infants with Late-Onset Sepsis: A National Survey. *Clinical Infectious Diseases*. Editor Václav Hrubý. 2005-01-15, vol. 40, issue 2, s. 218-224. DOI: 10.1086/426444. Dostupné z: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/426444>

15. NCB\_PBAK\_PP\_12\_059\_A. Identifikace mikroorganismů metodou hmotnostní spektrometrie analyzátozem VITEK MS. Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.
16. NCB\_PBAK\_PP\_12\_151. *Zpracování pozitivních hemokultur*. Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.
17. NSPV\_6. Základní mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému.
18. OXOID Limited – *hemokultivační systém* – návod k použití, 2005
19. *Pravidla českého pravopisu*. Vyd. v nakl. Euromedia Group 1. Praha: Knižní klub, 2014, 468 s. Universum (Knižní klub). ISBN 978-80-242-4609-3.
20. PRUCHA, Miroslav, Geoff BELLINGAN a Roman ZAZULA. Sepsis biomarkers. *Clinica Chimica Acta*. 2015, vol. 440, s. 97-103. DOI: 10.1016/j.cca.2014.11.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000989811400504X>
21. RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 1. vyd. Praha: Galén, 1999, 317 s. ISBN 8071849715.
22. SVOBODA, Petr. *Sepse v traumatologii a chirurgii*. Vyd. 1. V Praze: Triton, 2004, 199 s. ISBN 80-7254-550-7.
23. ŠRÁMOVÁ, Helena. *Nozokomiální nákazy*. Praha: Maxdorf, 1995, vii, 224 s. ISBN 80-85912-00-7.

24. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. 2009, vol. 17, issue 1. ISSN 1757-7241. Dostupné z:<http://www.sjtrem.com/content/17/1/67>
25. VOKURKA, Martin a Jan HUGO. *Velký lékařský slovník*. 9., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, c2009, xv, 1159 s. Jessenius. ISBN 978-80-7345-202-5.
26. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 8086850005.
27. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie II: přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 309 s. ISBN 80-210-2272-8.
28. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003, xxii, 495 s. ISBN 8090289665.
29. ZAHRADNICKÝ, Jiří. *Mikrobiológia a epidemiológia: Učebný text pre stredné zdravotnícke školy, odbor zdravotnícky laborant*. Martin: Osveta, 1991, 608 s. Učebnice pre stredné zdravotnícke školy. ISBN 8021703261.
30. ZÁVADA, Josef. *Syndrom multiorgánové dysfunkce*. 1. vyd. Praha: Grada, 2001, 254 s. ISBN 80-7169-781-8.