

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



Bakalářská práce

Septické stavy

Septic states

Edita Danielová

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Hradec Králové, 2021

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, paní Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D., za cenné rady, ochotu a vstřícnost.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 2021

Edita Danielová

OBSAH

1	Abstrakt.....	6
2	Abstract.....	7
3	Úvod.....	8
4	Zadání – Cíl práce.....	9
5	Definice sepse a základní pojmy.....	10
5.1	Systémová zánětlivá reakce.....	10
5.2	Infekce	11
5.3	Bakteriemie.....	11
5.4	Infekce krevního řečiště	11
5.5	Sepse	11
5.6	Těžká sepse.....	12
5.7	Septický šok	12
5.8	Syndrom multiorgánové dysfunkce	12
5.9	Syndrom multiorgánového selhání	12
6	Klinické a laboratorní známky sepse	14
6.1	Klinické známky sepse	14
6.1.1	SOFA skóre.....	16
6.1.2	Quick SOFA (qSOFA)	17
6.2	Laboratorní známky sepse.....	17
6.2.1	Dynamika laboratorního obrazu	18
6.2.2	Biomarkery.....	20
7	Nejčastější původci	25
7.1	Bakteriální infekce.....	25
7.1.1	Staphylococcus aureus	26
7.1.2	Streptococcus pneumoniae	27
7.1.3	Escherichia coli.....	27

7.1.4	Klebsiella spp.	28
7.1.5	Pseudomonas aeruginosa.....	28
7.2	Mykotické infekce	28
7.2.1	Candida albicans	29
7.2.2	Ostatní Candidy.....	30
7.2.3	Cryptococcus neoformans.....	30
7.3	Virové infekce	31
8	Laboratorní diagnostika infekcí krevního řečiště	32
8.1	Laboratorní diagnostika.....	32
8.1.1	Mikrobiologická diagnostika založená na jednorázovém odběru krve.....	33
8.1.2	Průkaz nukleových kyselin.....	38
8.1.3	Další metody	41
8.2	Virové infekce	41
8.3	Bakteriální infekce.....	42
8.4	Mykotické infekce	43
8.5	Parazitární infekce.....	44
9	Doporučené postupy a terapie	46
9.1	Potenciální léčba	47
10	Prevence.....	49
11	Diskuze a závěry	50
12	Seznam zkratk.....	53
13	Seznam použité literatury.....	55
14	Seznam tabulek	61

1 ABSTRAKT

Cíl: Septické stavy jsou závažné stavy, které pacienta ohrožují na životě. Aby se zabránilo úmrtí pacienta, je nutné tento stav včas diagnostikovat a zahájit vhodnou léčbu. Cílem této práce je shromáždění poznatků týkajících se problematiky klinických a laboratorních známek a diagnostiky sepse včetně doporučených postupů, terapie a prevence vzniku sepse.

Hlavní poznatky: Septické stavy mohou mít velmi odlišné laboratorní a klinické známky a dosud nejsou jasně definovaná kritéria k diagnostice sepse. Mezi nejčastější původce septických stavů patří zejména bakterie, sepse vyžaduje okamžité zahájení léčby. Infekce krevního řečiště lze diagnostikovat mnoha způsoby, základem je hemokultivace, v poslední době se však rozvíjí také molekulární metody.

Závěry: Byly vyhledány informace týkající se problematiky septických stavů a jejich klinických a laboratorních známek, diagnostiky a nejčastějších původců, diagnostiky infekcí krevního řečiště a doporučených postupů v terapii a prevenci. Rešerše byla zaměřena zejména na laboratorní známky septických stavů a mikrobiologickou diagnostiku infekcí krevního řečiště.

Klíčová slova: sepse, infekce krevního řečiště, hemokultivace

2 ABSTRACT

Background: Septic states are serious conditions that endanger the patient's life. To prevent the patient's death, this condition must be diagnosed in time and appropriate treatment initiated. The aim of this work is to gather findings related to clinical and laboratory signs and diagnosis of sepsis, including recommended procedures, therapy and prevention of sepsis.

Main findings: Septic states may have very different laboratory and clinical signs and criteria for the diagnosis are not yet clearly defined. Bacteria are one of the most common causes of septic states; sepsis requires immediate treatment. Bloodstream infections can be diagnosed in many ways, the basis is blood cultivation, but molecular methods have also been developed recently.

Conclusions: Informations were found on the issue of septic states and their clinical and laboratory signs, diagnosis and the most common causes, diagnosis of bloodstream infections and recommended procedures in therapy and prevention. The research was mainly focused on laboratory signs of septic states and microbiological diagnosis of bloodstream infections.

Keywords: sepsis, bloodstream infections, hemoculture

3 Úvod

Septické stavy jsou velmi závažné a ohrožují pacientův život. Z tohoto důvodu je zásadní včasná diagnostika a zahájení terapie. V posledních letech proběhly konference, na kterých byla definice sepse upravena a konkretizována. Sepse může mít různý klinický a laboratorní obraz v závislosti na původci a pacientovi, což komplikuje diagnostiku.

Důležitá je také problematika diagnostiky infekcí krevního řečiště, která je založená zejména na hemokultuře. Ne všechny původce těchto infekcí však lze kultivovat. Velkou pozornost proto mají v poslední době také metody molekulární biologie a jejich využití k diagnostice infekcí krevního řečiště.

Od původce se také odvíjí léčba, proto jsou terapeutické postupy spojeny s bližším určením patogenu, který septický stav způsobuje. Léčba také cílí na zachování životních funkcí pacienta a prevenci selhávání orgánů, důležité je také mírnění systémové zánětlivé reakce.

Vzhledem k závažnosti septického stavu je snaha předejít jeho rozvoji. Prevence se týká zejména zabránění rozvoje nozokomiální sepse související s hospitalizací pacienta.

4 ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této práce je shromáždění a rešerše poznatků z poslední doby, které se týkají problematiky definice a diagnostiky sepse, diagnostiky infekcí krevního řečiště a aktuálních doporučených postupů v terapii a prevenci sepse.

5 DEFINICE SEPSE A ZÁKLADNÍ POJMY

První popisy sepse pochází již z období starověkého Egypta, patogeny za ni zodpovědné byly však objeveny až mnohem později. Teprve na první Konsensuální konferenci v roce 1992 se začali odborníci podrobněji zabývat problematikou definice a diagnostiky sepse a během posledních let docházelo k jejímu postupnému upravování a konkretizování. Různé definice se zakládaly na klinickém rozpoznání septického stavu, vývoj tohoto rozpoznání měl na definici také velký vliv (Verdonk a kol., 2017).

American College of Chest Physicians a Society of Critical Care Medicine definovaly již v roce 1991 kritéria stádií infekce: bakteriémie, sepse, septický šok a multiorgánové selhání. Zároveň byl zaveden pojem systémová zánětlivá reakce (SIRS, systém inflammatory response syndrome) (Černý a kol., 2005).

V roce 2001 proběhla druhá mezinárodní Konsensuální konference, která se mimo jiné zabývala faktem, že definice SIRS není specifická pouze pro sepsi, nicméně nebyla navržena jiná, přesnější definice. K tomu došlo až mezi lety 2014 – 2016 na třetí Konsensuální konferenci, která se soustředila na rozlišení septických pacientů a pacientů s nekomplikovanými infekcemi na základě orgánového selhání. Z této konference vzešla nová definice sepse a septického šoku, která sepsi definuje jako „život ohrožující orgánovou dysfunkci způsobenou neregulovanou odpovědí organismu na infekci“ (Verdonk a kol., 2017).

5.1 Systémová zánětlivá reakce

Systémová zánětlivá reakce (Systemic inflammatory response syndrom, SIRS) je univerzální reakce organismu na řadu podnětů doprovázená rozvojem systémových známek zánětu. Tyto podněty mohou být infekční i neinfekční povahy a mohou mít zevní i vnitřní původ. Mezi zevní původce SIRS patří například fyzikální, chemické a biologické faktory, jako je radiace, mechanické a tepelné faktory, toxiny organického a anorganického původu, bakterie, viry, houby či plísně. Vnitřním původcem SIRS mohou být například nekrózy, trombózy či depozice soli ve tkáních. Pojem SIRS se používá u pacientů, kteří vypadají septičtí, ale není u nich přítomna infekce.

K diagnostice SIRS je nutná přítomnost alespoň dvou z těchto příznaků:

- teplota nad 38°C nebo pod 36°C
- srdeční frekvence nad 90 tepů za minutu
- tachypnoe
- leukocytóza

Tyto změny nesmí být projevem jiného onemocnění, které je jimi definováno, a musí být akutní změnou stavu (Černý a kol., 2005, Svoboda a kol., 2004).

5.2 Infekce

Jako infekce je definovaná přítomnost mikroorganismů v normálně sterilní tkáni, nebo přítomnost mikroorganismů vedoucí k rozvoji zánětlivé reakce (Streitová a kol., 2015).

5.3 Bakteriemie

Pojmem bakteriemie se označuje přítomnost životaschopných bakterií v krvi. U zdravých jedinců se vyskytuje běžně, bakterie se do krve mohou dostat z míst, která jsou jimi osídlena, či z míst, kde je rozvinut lokální zánět. Bakterie jsou fagocytovány a jejich přítomnost tudíž nemusí vést k rozvoji infekce krevního řečiště (Čermák a kol., 2008).

5.4 Infekce krevního řečiště

Infekce krevního řečiště (IKR) je stav, kdy jsou s průnikem mikroorganismů do krve přítomné celkové známky infekčního procesu. Častým původcem IKR jsou bakterie, vyskytují se však i virové, mykotické a parazitární IKR (Čermák a kol., 2008, Zima, 2013).

5.5 Sepse

Sepse je akutní systémová reakce na mikroorganismy, které napadají normálně sterilní tkáň. Tato systémová reakce je provázena silnou imunitní reakcí, která může vést až k orgánové dysfunkci (Rózsa a kol., 2017).

Jedná se o specifický typ SIRS, při kterém je prokázána infekce. Průkaz infekce nemusí být k diagnóze sepse nutný, a to v případě, že je situace klinicky jasná (např. rána s hnisavou sekrecí). Pokud je však přítomna infekce, ale pacient nesplňuje podmínky SIRS, nejedná se o sepsi (Svoboda a kol., 2004).

Rozvoj sepse odráží závažnost stavu. S její progresí stoupá mortalita pacientů, která je v případě SIRS 6 – 27 %, při rozvoji septického šoku však stoupá až k 82 % (Černý a kol., 2005).

5.6 Těžká sepsi

Svoboda a kol. definuje těžkou sepsi jako „sepsi s orgánovou dysfunkcí a známkami hypoperfuze nebo sekundární hypotenze.“ Je přítomna laktátová acidóza, oligurie, hypoxie a pokles trombocytů, v důsledku mozkové hypoperfuze může také docházet k akutním změnám vědomí (Svoboda a kol., 2004, Streitová a kol., 2015).

5.7 Septický šok

Septický šok vzniká progresí těžké sepse. Jedná se o stav, kdy i přes adekvátní resuscitaci infuzní terapií přetrvává těžká hypotenze (systolický tlak pod 90 mm Hg), hypoperfuze a orgánová dysfunkce (Svoboda a kol., 2004).

5.8 Syndrom multiorgánové dysfunkce

Syndrom multiorgánové dysfunkce (Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS) je častou komplikací sepse, nicméně není definovaný Konsensuální konferencí. Jedná se o postupné či paralelní selhání dvou a více orgánů v důsledku rozvoje sepse. Orgány v tomto stavu nejsou schopny zajistit homeostázu bez terapeutického zásahu. MODS může postihnout kterýkoliv orgán, typické je selhávání ledvin či jater (Streitová a kol., 2015, Svoboda a kol., 2004).

5.9 Syndrom multiorgánového selhání

Syndrom multiorgánového selhání (Multiorgan Failure, MOF) je extrémní formou MODS, při kterém dochází k multiorgánovému selhání, které často vede ke smrti

pacienta. MOF, stejně jako MODS, není pojem definovaný Konsensuální konferencí, ale všeobecně se používá, protože nejlépe popisuje tento závažný stav (Svoboda a kol., 2004).

6 KLINICKÉ A LABORATORNÍ ZNÁMKY SEPSE

6.1 Klinické známky sepsy

Konsensuální konference definovala v roce 1992 také kritéria klinického obrazu odpovědi organismu na infekce. Tato kritéria jsou však velmi úzká, obtížně zjistitelná v určitých situacích (např. dechová frekvence pacienta na ventilaci) nebo založená na subjektivním pohledu (hypotenze přetrvávající i při adekvátním doplnění tekutin). V praxi se proto nepoužívají pouze tato kritéria, ale doplňují se kombinací dalších klinických příznaků (Černý a kol., 2005).

Klinické příznaky sepsy se mohou lišit na základě původního místa infekce, stavu organismu, doby před zahájením léčby či postupu selhávání orgánů. Selhávání orgánů nejčastěji zasahuje dýchací a kardiovaskulární systém, může se projevit jako syndrom akutní dechové tísně (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) – tzv. septická plíce, hypoxemie a hypotenze či zvýšení laktátu v séru. Dysfunkce centrální nervové soustavy se projevuje změnami mentálního stavu, zmateností, poruchami vědomí. Postižení ledvin vede k oligurii až anurii a zvýšení hladiny kreatininu v séru (Angus a van der Poll, 2013; Zima, 2013).

Mezi kritéria, která upozorňují na možnou sepsi, patří vysoké horečky nebo někdy naopak hypotermie, tachykardie a tachypnoe, hypotenze, známky periferní vazodilatace, otoky, nedostatečná diuréza, rozvoj jinak nevysvětlitelného šoku, zvýšená hladina cukru v krvi či změny mentálního stavu (například zmatenost). U některých pacientů však můžeme pozorovat i jiné, atypické symptomy. Jedná se zejména o pacienty s oslabeným imunitním systémem. Tyto symptomy se mohou vyskytnout i u jiných onemocnění (např. pankreatitida) či u úrazů, popálenin, nádorových onemocnění nebo mozkových krvácení. To ztěžuje odlišení pacientů se sepsí od pacientů s podobnými symptomy, ale bez přítomnosti infekce (Černý a kol., 2005; Streitová a kol., 2015).

Rozdíly v klinickém obrazu sepsy mohou být způsobeny i jejím původcem. Například v případě sepsy způsobené infekcí gramnegativními bakteriemi bývá klinický obraz výrazně šokový s cyanózou, mramoráží a nauzeou. U těchto pacientů hrozí také rozvoj diseminované intravaskulární koagulace (DIC) a dysfunkce plic. Naproti tomu

kandidová sepsse či sepsse způsobená grampozitivními nebo anaerobními bakteriemi se projevuje cyanózou a mramoráží jen vzácně. Sepsse se projevív hyperkinetickým oběhem, hyperkalémií, zvýšením hladiny bilirubinu a sekundární anémií (Zima, 2013).

Vzhledem k podobnosti symptomů sepsse se symptomy SIRS je vždy jako první nutné zvážít možnou neinfekční příčinu. Černý a kol. uvádí jako neinfekční příčiny SIRS tyto:

- **Poranění tkání** – trauma, operace, infarkt myokardu či plicní infarkt, hematom nebo trombóza, rejekce transplantátu, pankreatitis, erythrodermie
- **Metabolické příčiny** – tyreotoxická krize, akutní insuficience nadledvin
- **Příčiny související s léčbou** – krev a její deriváty, syndrom maligní hypertermie, granulocytární makrofágový colony stimulating factor (GM-CSF), neuroleptický maligní syndrom, opiáty/benzodiazepiny
- **Maligní onemocnění** – lymfom, syndrom rozpadu tumoru
- **Neurologické příčiny** – subarachnoidální krvácení

Další problematikou klinického obrazu sepsse jsou možné odlišné symptomy u dětí. Zejména u menších dětí může být obtížnější sepsi rozpoznat, protože symptomy jsou velmi nespecifické, a ještě méně zřejmé než u dospělých.

U starších dětí se objevují zejména symptomy související s infekcí a rozvojem sepsse doprovázené symptomy SIRS. Oproti tomu novorozenci zpočátku vykazují jen nepatrné změny, jako jsou například epizody bradykardie, krátkodobé zástavy dechu (apnoe) či intolerance potravy.

Zatímco u dospělých se sepsse obvykle projevuje snížením cévního odporu v důsledku vazodilatace, hypotenzí a tachykardií s normálním či zvýšeným srdečním výdejem, u dětí je často zachován normální krevní tlak a srdeční výdej bývá spíše snížený. Téměř 50 % dětí vykazuje vazokonstrikci a s ní související zvýšený odpor cév. Hypotenze se u pediatrických pacientů mnohdy objevuje až ve stádiu septického šoku (Candel a kol., 2018).

6.1.1 SOFA skóre

Vzhledem k nespecifitě symptomů a nutnosti rychlé diagnózy se začal používat nový způsob identifikace sepse či septického šoku, tzv. skóre SOFA (Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment). Jedná se o systém používající snadno dostupné klinické parametry k identifikaci dysfunkce či selhávání klíčových orgánů v důsledku sepse. SOFA skóre také umožňuje lépe předvídat závažnost stavu a riziko úmrtí (Rello a kol., 2017).

Skóre SOFA patří mezi screeniny využívané k monitorování stavu pacienta, zejména kvůli riziku rozvoje sepse, ke kterému může dojít kdykoli. Jedná se o screening, který není založen na SIRS a jeho symptomech (Bhattacharjee a kol., 2017).

Vzniklo v roce 1994 v návaznosti na Konsensuální konferenci s cílem popsat co nejobjektivněji stupeň orgánového selhání či dysfunkce. Je založeno na šesti různých kritériích, popisujících funkci respiračního systému, kardiovaskulárního systému, jater, koagulace, ledvin a nervového systému. Každému kritériu se přiřazuje hodnota 0 – 4, která popisuje stupeň orgánové dysfunkce a reflektuje její případné zhoršení. V případě, že zjištěné parametry neodpovídají parametrům SOFA, přiřazuje se hodnota 0. Skóre SOFA se zaznamenává každých 24 hodin, pokud se hodnoty skóre neshodují u všech parametrů, uvádí se nejvyšší hodnota (Lambden a kol., 2019).

Tabulka 1: SOFA skóre (zdroj: Holub, 2018 – převzato, přeloženo a upraveno)

	1	2	3	4
Respirace PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	< 400	< 300	< 200 umělá ventilace	< 100 umělá ventilace
Nervový systém Glasgow coma score	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
Kardiovaskulární systém Arteriální tlak nebo nutnost podání vazopresorů	< 70 mmHg	dopamin ≤ 5 μg/kg/min nebo dobutamin	dopamin > 5 μg/kg/min nebo epinephrin ≤ 0.1 μg/kg/min nebo norepinephrin ≤ 0.1 μg/kg/min	dopamin > 15 μg/g/min nebo epinephrin > 0.1 μg/kg/min nebo norepinephrin > 0.1 μg/kg/min
Játra Bilirubin (μmol/l)	20 - 32	33 -101	102 - 204	> 204
Koagulace Destičky x 10 ³ /μl	< 150	< 100	< 50	< 20
Ledviny Kreatinin (μmol/l)	110 - 170	171 - 299	300 - 440	> 440

6.1.2 Quick SOFA (qSOFA)

Vzhledem ke komplexnosti skóre SOFA, nedostatku potřebných dat u mnoha pacientů a obavám z pozdní identifikace se toto skóre může jevit jako nepraktické v klinické praxi. V roce 2016 bylo proto SOFA skóre zjednodušeno a modifikováno na tzv. quick SOFA (qSOFA), které umožňuje snazší identifikaci pacientů potenciálně ohrožených úmrtím v důsledku sepse.

Toto zjednodušené skórování je založeno pouze na třech kritériích, kterými jsou:

- Alterace vědomí
- Systolický krevní tlak ≤ 100 mmHg
- Dechová frekvence ≥ 22 /min

Přítomnost alespoň dvou z těchto parametrů značí orgánovou dysfunkci. Zjednodušení skórování spočívá zejména v jednoduchosti a rychlosti měření kritérií.

Tato modifikace a zjednodušení SOFA skóre je však také kritizována, protože zejména v časném stádiu sepse, kdy je léčba nejúčinnější, nemusí být dostatečně citlivá. U pacientů s pneumonií může být citlivost této metody skórování pouze 50 % a lze předpokládat nižší citlivost také například u hematologických pacientů (Rello a kol., 2017; Marik a Taeb, 2017).

6.2 Laboratorní známky sepse

Laboratorní známky umožňují snáze rozpoznat probíhající sepsi a odlišit ji od SIRS. Včasná diagnostika sepse výrazně snižuje mortalitu a laboratorní známky, zejména pak některé biochemické parametry, diagnostiku výrazně urychlují. Zároveň se díky včasné a přesné diagnostice dá předejít nesprávné léčbě, jako je například léčba pacienta se SIRS širokospektrými antibiotiky, která zvyšuje riziko rozvoje antibiotické rezistence. Zejména v časném stádiu sepse pak laboratorní diagnostika umožní také lépe predikovat riziko úmrtí (Fan a kol., 2016).

V roce 1979 definovali Siegel a Cerra čtyři stadia sepse, rozdělená na základě oběhových a metabolických změn a na odrazu těchto změn v klinickobiochemickém obraze. Pro použití tohoto rozdělení je však potřeba měření a hodnocení

klinickobiochemických parametrů v reálném čase, což vyžaduje komplexní počítačové hodnocení a patřičné technické vybavení. Zřejmě proto se toto dělení příliš nevyužívá v praxi, nicméně je velmi objektivní a dosud nebylo navrženo lepší.

Siegel a Cerra sepsi rozdělili na tato stádia:

- **Stadium A** – kompenzovaná sepse: stresová odpověď organismu spojená s tachykardií, zvýšeným srdečním výdejem, kontraktilitou a spotřebou kyslíku, metabolismus je bez abnormalit
- **Stadium B** – metabolická insuficience: zvýraznění hyperdynamiky oběhu s nižší extrakcí kyslíku, příjem kyslíku periferními tkáněmi klesá, dochází k metabolické acidóze
- **Stadium C** – respirační insuficience: srdeční výdej normální či zvýšený, rozvoj hypotenze, respirační insuficience
- **Stadium D** – kardiální insuficience: prohloubení hypotenze, pokles kontraktility a srdečního výdeje, perfuze periferie ještě více klesá

V jednotlivých stádiích postupně dochází ke změnám hemodynamických a endokrinologických nálezů, krevních plynů a ke změnám v metabolismu cukrů, tuků i bílkovin. Tyto změny mají vliv na klinickobiochemické parametry (Zima, 2013).

Součástí laboratorní diagnostiky sepse je také odběr krve na hemokulturu. Hemokultivace má však své limity – například nutnost odebrání krve před zahájením antibiotické léčby. Problémem také je, že velká část hemokultur je vyhodnocena jako negativní, ačkoli se jedná o sepsi. Problematická je také doba trvání diagnostiky – nejprve je nutné inkubovat a diagnostikovat pozitivní hemokulturu a až poté je možné identifikovat konkrétní patogen a zvolit konkrétní antibiotickou léčbu. Tato časová prodleva není v diagnostice sepse příliš žádoucí, a proto je snaha o možnost diagnostikovat sepsi rychleji, přímo z krve pacienta, bez inkubace hemokultury (Candel a kol., 2018).

6.2.1 Dynamika laboratorního obrazu

Změny vyvolané infekčním agens, jeho toxiny a také vzniklé cytokiny se promítají také do laboratorního obrazu, který se s rozvojem sepse mění. Tyto změny se projeví

v metabolismu, spotřebě kyslíku, ventilaci, změně glykémie, počtu leukocytů a v hemokoagulačním systému.

Již zpočátku sepse dochází ke zvýšení metabolismu, které souvisí se vzestupem tělesné teploty.

Pokud má pacient třesavku, výrazně se zvyšuje spotřeba kyslíku. V důsledku zvýšené spotřeby je žilní krev desaturovaná, což vede k centrální cyanóze a hyperlaktátémii, a to i přesto, že kyslíkové parametry v arteriální krvi mohou mít uspokojivé hodnoty. Pokud se rozvine syndrom akutní dechové tísně, dochází k dalšímu výraznému zvyšování laktátémie.

Třesavka vede také k hyperventilaci, v jejímž důsledku klesá koncentrace oxidu uhličitého v krvi, vzniká přechodná hypokapnie a respirační alkalóza. Námaha dýchacích svalů vyústí v hypoventilaci vedoucí naopak k hyperkapnii a respirační acidóze.

U pacientů se sepsí dochází k výraznému zvýšení glykémie, a to až na hodnoty 15 – 20 mmol/l, u diabetiků až na hodnotu 25 mmol/l, a to i při kontinuálním podávání inzulinu.

Úměrně s rozvojem sepse stoupá počet leukocytů. Kromě leukocytů stoupá také hladina markerů infekce, jako jsou například C-reaktivní protein (CRP) a prokalcitonin (PCT). Výrazně stoupá i hladina D-dimerů – produktů degradace fibrinu, které vznikají při spontánní fibrinolýze.

Zejména vlivem gramnegativních tyčů a endotoxinů v krvi dochází k aktivaci hemokoagulačního systému. Dochází ke snížení počtu trombocytů, toto snížení je výrazné zejména v případě sepse způsobené gramnegativními bakteriemi. Mírně klesá také hladina fibrinogenu, jsou sníženy plazmatické koagulační faktory.

Mezi další změny patří také vzestup alaninaminotransferasy (ALT), hladiny myoglobinu v séru s následnou myoglobinurií, či zvýšení hladiny bilirubinu a kalémie v důsledku infekce hemolyticky aktivními mikroby (Zima, 2013).

6.2.2 Biomarkery

Biomarker je definován jako „charakteristika, která je objektivně měřitelná a vyhodnocená jako indikátor normálních biologických procesů, patologických procesů nebo farmakologických odpovědí na terapeutický zásah“ (Rello a kol., 2017).

V ideálním případě by měla hladina biomarkeru rychle a specificky stoupnout s rozvojem sepse a při účinné terapii rychle klesnout, biomarker by také měl být snadno a rychle stanovitelný. Zatím však nebyl objeven žádný biomarker, který by všechny tyto podmínky splňoval (Candel a kol., 2018).

Biomarkery mohou být v klinické praxi využívány také k přesnějšímu určení prognózy onemocnění, k diagnostice nebo k predikci efektivity či toxicity léčby (Rello a kol., 2017).

Využívání konkrétních biomarkerů pro diagnostiku sepse se v průběhu let měnilo a vyvíjelo. V 80. letech 20. století se využití biomarkerů soustředilo na zánětlivou fázi, důležité byly zejména prozánětlivé cytokiny a CRP. V 90. letech byly objeveny změny PCT související s bakteriální infekcí a začalo se o něm uvažovat jako o potenciálním biomarkeru sepse. Do upravené definice sepse bylo ale zvýšení CRP a PCT zařazeno až v roce 2003 (Faix, 2013).

CRP a PCT patří mezi nejvíce studované biomarkery sepse. Jejich hladina výrazně stoupá s rozvojem sepse a je zvýšená dostatečně dlouho, aby ji bylo možné stanovit (Candel a kol., 2018; Pierrakos a kol., 2020)

Nadále je snaha studovat potenciální nové biomarkery související se změnami spojené s průběhem sepse. Biomarkery samy o sobě k diagnostice nestačí, výrazně však pomáhají identifikovat kriticky nemocné pacienty (Faix, 2013).

Nové potenciální biomarkery jsou zpravidla navrhovány na základě jejich hodnoty v diagnostice či prognóze sepse. To však samo o sobě nestačí, aby byl biomarker klinicky významný. Biomarkery by měly být také odpovědí na klinicky důležitou, specifickou otázku, jako je například riziko rozvoje ARDS. Ačkoli je navrženo relativně velké množství potenciálních biomarkerů sepse, pouze málo z nich bylo prokázáno jako skutečně klinicky významné, protože velká část z nich nebyla zkoumána v dostatečně rozsáhlé studii (Pierrakos a kol., 2020).

Pro účely využití biomarkerů dělí Rello a kol. sepsi na dvě fáze: zánětlivou a imunosupresivní. Zánětlivá fáze je charakterizována SIRS, imunosupresivní fázi charakterizuje syndrom kompenzační protizánětlivé odpovědi (CARS, compensatory anti-inflammatory response syndrome) a orgánová dysfunkce. Biomarkery se dělí na prozánětlivé biomarkery, biomarkery imunosupresivní fáze a biomarkery orgánové dysfunkce (Rello a kol., 2017).

6.2.2.1 Prozánětlivé biomarkery

Mezi prozánětlivé biomarkery patří CRP a PCT. CRP je protein akutní fáze, jeho koncentrace v plazmě je u zdravých pacientů stálá. Výrazné zvýšení CRP vyvolávají zejména bakteriální infekce, jeho hladina v krvi však stoupá také po traumatu či zánětu. Zvýšení hladiny CRP je vyvoláno poškozením tkání, stimuluje ho zejména interleukin-6 (IL-6), ale vliv na produkci CRP mají i ostatní cytokiny, jako například interleukin-1 (IL-1) či tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α). Hladina CRP v plazmě a její změny jsou důležité pro diagnostiku a prognózu infekce a jsou také ukazatelem účinnosti léčby. Výhodou CRP je relativní stálost jeho hladiny v plazmě, na rozdíl od ostatních proteinů akutní fáze, a také levnější testování (Rello a kol., 2017).

Pravidelné měření hodnoty CRP je v klinické praxi využíváno spíše k monitorování léčby, protože její pokles v prvních 48 hodinách po zahájení léčby značí její účinnost. Hodnota CRP je však užitečná i při diagnostice sepse (Rello a kol., 2017, Pierrakos a kol., 2020).

CRP jako biomarker je však poměrně nespecifický. Není možné na základě jeho zvýšené hladiny odlišit sepsi od ostatních onemocnění, protože je zvýšená i u jiných zánětlivých onemocnění. Vzhledem k citlivosti měření CRP se využívá také k monitorování pacientů po operacích a je velmi důležitý pro identifikaci novorozenecké sepse (Rello a kol., 2017; Candel a kol., 2018).

Důležitým biomarkerem systémových zánětlivých reakcí je PCT. V krvi je běžně přítomen jen ve velmi nízkých koncentracích, jeho produkci stimuluje prozánětlivé cytokiny a bakteriální endotoxiny. Oproti ostatním biomarkerům sepse je díky PCT potenciálně možné rozlišit infekční a neinfekční systémové zánětlivé reakce a pacienty, kteří jsou méně rizikováni. Také je potenciálně možné rozlišit bakteriální a virovou infekci

a rozpoznat přítomnost bakteriální superinfekce u pacienta s virovým onemocněním. Hladina PCT umožňuje předvídat riziko rozvoje sepse – s jejím zvýšením stoupá pravděpodobnost systémové infekce a sepse. PCT je nejcitlivější biomarker používaný k diagnostice či vyloučení bakteriální sepse, rychlý vzestup hladiny PCT v případě bakteriální infekce umožňuje časnou diagnostiku a monitorování vývoje sepse. Změny hladiny PCT v séru mohou být také využity k monitorování účinnosti léčby (Rello a kol., 2017, Candel a kol., 2018).

Dalším prozánětlivým biomarkerem je IL-6, který patří mezi prozánětlivé cytokiny. Jedná se o endogenní pyrogen, který má však v krvi delší poločas než jiné prozánětlivé markery, jako je například interleukin 1 (IL-1) či tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α). Jeho syntéza je mimo jiné ovlivněna také endotoxiny, které stimulují tvorbu IL-6. Jedná se o užitečný biomarker, nicméně samotné zvýšení IL-6 není specificky spojeno se septickým stavem pacienta (Mierzchała-Pasierb a Lipińska-Gediga, 2019).

6.2.2.2 Biomarkery imunosupresivní fáze

Ačkoli se o důležitosti CARS ví už dlouho, biomarkerům této fáze se začala věnovat pozornost až v poslední době. Biomarkerem imunosupresivní fáze je pokles produkce hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy (human leukocyte antigen, HLA-DR), zejména u monocytů. Expres HLA-DR na povrchu buňky hraje roli v prezenci antigenu a je proto důležitou součástí imunitní odpovědi. Monocyty se sníženou expresí HLA-DR mají nižší schopnost produkce cytokinů a prezentace antigenu, toto snížení je tudíž znakem imunosuprese.

Snížená exprese HLA-DR však není přítomná pouze u septických pacientů, dochází k ní také při oslabení imunitního systému z jiných důvodů. Velmi nízké hodnoty exprese HLA-DR mohou být znakem horší prognózy sepse a vyššího rizika nozokomiálních infekcí (Faix, 2013, Rello a kol., 2017).

6.2.2.3 Biomarkery orgánové dysfunkce

Jedním z biomarkerů orgánové dysfunkce je laktát, který vzniká v důsledku hypoperfuze. Pokud je perfuze tkání nízká, dochází ke vzniku hyperlaktátémie, která je znakem sepse. Protože laktátová clearance je závislá na funkci ledvin a jater, může být vysoká hladina laktátu způsobena nadměrnou produkcí či změněnou clearance znakem

orgánové dysfunkce. Produkce laktátu je úzce spojena s hypoperfuzí tkání, pomáhá odhadovat stádium septického stavu a určit jeho prognózu (Rello a kol., 2017)

U kriticky nemocných pacientů se laktát měří často, v případě sepse se využívá k zjištění závažnosti infekce, určení prognózy a k monitorování léčby. Vysoké koncentrace laktátu v séru značí horší prognózu. Laktát může potenciálně mít vliv na imunitní systém jako imunosupresivní metabolit a je jeden z potenciálních faktorů, které mohou mít vliv na rozvoj imunosupresivní fáze sepse (Nolt a kol., 2018).

V patofyziologii sepse hraje důležitou roli anaerobní metabolismus, a kromě laktátu je s ním spojena také změna parciálního tlaku oxidu uhličitého. V případě aerobního metabolismu dochází k tvorbě oxidu uhličitého, jehož množství je určeno bazálním metabolismem a respiračním kvocientem. V případě anaerobního metabolismu však dochází k metabolické acidóze a v těle se pak tvoří více oxidu uhličitého, který je výsledkem kompenzace acidózy. Oxid uhličitý je navíc více rozpustný v krvi než kyslík, takže se snáz dostane do venózního řečiště a je proto citlivým biomarkerem hypoperfuze. Měření parciálního tlaku oxidu uhličitého informuje o stavu mikrocirkulace, perfuzi tkání a kapacitě kardiiovaskulárního systému odvádět tkáněmi produkovaný oxid uhličitý a umožňuje predikci rozvoje septického šoku (Rello a kol., 2017).

Dalším potenciálním biomarkerem je adrenomedullin (ADM), peptid podobného druhu jako je PCT. Jedná se o důležitý vazodilatační hormon, který se podílí na regulaci endotelové bariéry a cévního tonu inhibicí kontrakce endoteliálních buněk. Stabilizuje endoteliální bariéru a tím chrání mikrocirkulaci během zánětlivé reakce. ADM snižuje hyperpermeabilitu kapilár a má protizánětlivé a antibakteriální vlastnosti (Mierzchała-Pasierb a Lipińska-Gediga, 2019; Ajith Kumar, 2020).

Protože se však ADM krví transportuje navázaný na proteiny a je z ní velmi rychle odbourán, nelze stanovit jeho hodnotu v krvi. Lze však stanovit hodnotu proadrenomedullinu (MR-proADM), která reflektuje množství ADM (Rello a kol., 2017).

MR-proADM je nejdůležitějším biomarkerem k určení prognózy sepse – jeho hodnota je nejvíce spojena s mortalitou. U pacientů, kteří mají trvale zvýšenou hladinu MR-proADM a klesající hladinu PCT, je výrazně vyšší riziko úmrtí. Změny hodnot

MR-proADM lze potenciálně využít k odhalení pacientů, u kterých hrozí selhání antimikrobiální léčby (Mierzchała-Pasierb a Lipińska-Gediga, 2019; Rello a kol., 2017).

6.2.2.4 Pokroky v detekci biomarkerů

Spolu s pokroky v mikrobiologické diagnostice se rozvíjí také diagnostika biomarkerů sepse. Tyto pokroky výrazně urychlují diagnostiku a identifikaci patogenu a umožňují optimalizaci léčby. Jedná se zejména o rozvoj technik molekulární biologie, které testují nukleové kyseliny, založené na lýze patogenu či extrakci a amplifikaci nukleové kyseliny (metoda polymerázové řetězové reakce). Dále se jedná o další metody identifikace patogenu, jako například hybridizace založená na ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), fluorescenční detekci nebo sekvenování. Další metodou, kterou lze použít, je také hmotnostní spektrometrie, a to buď metoda ionizace za účasti matrice (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI) s detekcí analyzátozem doby letu (time of flight, TOF), či spojení polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR) s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem (electrospray ionization, ESI). Výhodou metody PCR/ESI je, že není nutné čekat na pozitivní kultivaci (Perner a kol., 2016).

Hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry, MS) vyžaduje separovaný vzorek a vhodnou instrumentaci skládající se ze zdroje ionizace, analyzátoru a detektoru. Často je nutné vzorek separovat z komplexní matrice. To lze udělat různými chromatografickými metodami či pomocí kapilární zónové elektroforézy. Ionizuje se obvykle metodami ESI či MALDI, k analýze a detekci se využívají například orbitrap, kvadrupól, iontová past či TOF.

Lze také analyzovat fyziologicky významné malé molekuly, které mají podíl na metabolických procesech. Jejich kvantifikaci je možné zjistit stav buněk a tkání. Tyto molekuly lze analyzovat metodou MS či nukleární magnetickou rezonancí (nuclear magnetic resonance, NMR). Zásadní rozdíl mezi těmito metodami je, že MS je na rozdíl od NMR destruktivní metoda.

Hmotnostní spektrometrie bývá často spojena s plynovou či kapalinovou chromatografií (Ludwig a Hummon, 2017).

7 NEJČASTĚJŠÍ PŮVODCI

Sepe může být důsledkem komunitních i nozokomiálních nákaz. Z nozokomiálních nákaz převládají zejména pneumonie, další časté zdroje sepse jsou intraabdominální infekce a infekce močových cest. Z komunitních nákaz jsou častým zdrojem sepse opět pneumonie, dále pak infekce měkkých tkání a gastrointestinálního traktu (Angus a van der Poll, 2013; Kolář, 2016).

Nejčastěji jsou sepe způsobeny grampozitivními či gramnegativními bakteriemi, vyskytují se však také mykotické sepe způsobené zejména kvasinkami (Zima a kol., 2013).

Velmi vzácně jsou diagnostikovány také virové sepe, nicméně nelze přesně říct, jak často se tento typ sepse vyskytuje. Nejsou také stanovena jasná kritéria k jednoznačné identifikaci virové sepse, ani k jejímu odlišení od sepse bakteriální (Lin a kol., 2018).

7.1 Bakteriální infekce

Mezi nejčastější původce sepse patří zejména grampozitivní a gramnegativní bakterie. Z grampozitivních bakterií se jedná zejména o kmeny *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pneumoniae*, z gramnegativních bakterií jsou to hlavně *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* (zejména *Klebsiella pneumoniae*) a *Pseudomonas aeruginosa* (van der Poll a Opal, 2008; Angus a van der Poll, 2013; Kolář, 2016).

Příčinou septických stavů mohou být také polymikrobiální infekce či infekce anaeroby. Zatímco dříve byly velmi časté zejména infekce gramnegativními bakteriemi, mezi lety 1979 a 2000 výrazně stoupl počet infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi (van der Poll a Opal, 2008; Angus a van der Poll, 2013).

Co se týče dalších bakteriálních původců sepse, nelze nalézt mezi autory odborných článků přesnou shodu. Velmi často se mezi uváděnými původci objevují *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacteroides spp.*, *Enterococcus spp.* a *Enterobacter spp.* Další uváděné kmeny se liší podle autora. Zatímco Kolář uvádí jako další původce kmeny *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* či *Burkholderia cepacia complex*, Zima a kol. uvádí kmeny *Haemophilus influenzae*,

Chlamydophilla pneumoniae, *Neisseria meningitis*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella* spp. či *Proteus* spp., Rózsa a kol. uvádí jako možné původce sepse také *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp. a *Bacteroides* spp. Van der Poll a Opal zmiňují *Clostridium difficile* jako původce abdominální sepse. Mezi nejčastější bakteriální původce dětské a novorozenecké sepse patří dle Candel a kol. kromě výše zmíněných nejčastějších původců sepse také například kmeny *Neisseria meningitis*, *Bordetella pertusis*, *Acinetobacter* spp., či *Salmonella* spp. (Zima a kol., 2013; Kolář, 2016; Rózsa a kol., 2017; van der Poll a Opal, 2008; Candel a kol., 2018).

Tabulka 2: Původci bakteriálních sepsí – diagnostika
(zdroj: Votava a kol., 2010 – přepracováno z textu do tabulky)

Kmen	Agar	Kolonie	Další metody průkazu
<i>Staphylococcus aureus</i>	Běžné půdy Krevní agar s 10 % NaCl Agar s mannitolem a solí Columbia agar s kolistinem a kyselinou nalidixovou Agar s fenylethylalkoholem Chromogenní pro MRSA	Nazlátlé, pigmentované	Mikroskopie
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Vlhké obohacené půdy Krevní agar se stafylokokovou čarou při zvýšené tenzi CO ₂	Hlenovité, bezbarvé, někdy lesklé	Optochinový test Test rozpustnosti ve žluči Latexový test Průkaz antigenů
<i>Escherichia coli</i>	Endův agar	Kovový lesk	Biochemie Antigenní analýza
	McConkey agar	Bledé	
<i>Klebsiella</i> spp.	Endův agar	Růžové	PYR-test Průkaz produkce širokospektrých beta-laktamas
	Běžné půdy	Bílé, hlenovité	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Běžné půdy	Tvorba pigmentu (žlutý, zelený až hnědý) Pach připomínající jasmín	Biochemické určení
	Krevní agar	Hemolýza	
	Endův agar	Fialové	

7.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je grampozitivní fakultativně anaerobní bakterie patřící mezi koagulázapozitivní stafylokoky. Jedná se o velmi častý a rozšířený kmen, který se běžně vyskytuje na kůži nebo na sliznicích. Pokud se však poruší přirozená odolnost organismu vůči tomuto kmeni, pronikne do tkání, kde působí jako patogen a způsobuje mnoho různě závažných infekcí, které mohou vyústit až v sepsi.

K infekci obvykle dochází při oslabení organismu, můžou k ní však přispět také predisponující faktory, jako například chirurgický zákrok, úraz, zavedený katétr či diabetes. Patogenitu kmene *Staphylococcus aureus* podporují enzymy a toxiny, které produkuje a které usnadňují šíření infekce a pronikání hlouběji do tkání (Bednář a kol., 1996, Votava a kol., 2003).

7.1.2 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, známý též jako pneumokok, je grampozitivní kok patřící mezi viridující streptokoky. V barvení podle Grama lze pozorovat jednotlivé koky, dvojice koků (tzv. diplokoky) či krátké řetízky diplokoků. Je častým původcem pneumonií, meningitid (většinou sekundárních) a sepse. Často se jedná o endogenní infekce, infekcím dýchacích cest předchází pokles imunity například vlivem infekce vyvolané jinými patogeny. Hlavním faktorem virulence je polysacharidové pouzdro, které streptokoka chrání před fagocytózou.

Streptococcus pneumoniae se vyskytuje také v neopouzdrěné formě, ve které je běžnou součástí normální mikroflóry a kolonizuje sliznice horních cest dýchacích (Bednář a kol., 1996, Votava a kol., 2003).

7.1.3 *Escherichia coli*

Jedná se o gramnegativní nespořulující fakultativně anaerobní pohyblivé tyčinky patřící do čeledě *Enterobacteriaceae*. Je to velmi významná bakterie, slouží jako modelový organismus či jako indikátor fekální kontaminace pitné vody. *Escherichia coli* je běžnou součástí střevní mikroflóry, kde se podílí na tvorbě vitaminů, zejména vitaminu K. Pokud se však nachází mimo střevo, působí téměř vždy patogenně. Jedná se o podmíněně patogenní mikroorganismus.

Onemocnění, která *Escherichia coli* vyvolává, mohou být extraintestinální či intestinální. V případě extraintestinálních onemocnění se jedná zejména o uroinfekce, infekce ran, hnisavé procesy a sepsi. Tyto infekce mají často endogenní původ. Intestinální onemocnění způsobená tímto kmenem jsou zejména infekce provázené průjmy (Bednář a kol., 1996, Votava a kol., 2003).

7.1.4 *Klebsiella* spp.

Bakterie rodu *Klebsiella* jsou gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky z čeledi *Enterobacteriaceae*, narozdíl od *E. coli* nepohyblivé. Mají výrazné polysacharidové pouzdro. Jedná se o oportunní patogen, je velmi častým původcem infekcí močových cest a způsobuje infekce cest dýchacích. Uplatňuje se jako původce nozokomiálních nálezů, obvykle u novorozenců a na jednotkách intenzivní péče. Je častým původcem zejména nozokomiálních sepsí. Nejběžnější a nejvýznamnější druhy jsou *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca* (Votava a kol., 2003).

7.1.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je nejčastější a nejdůležitější druh rodu *Pseudomonas*. Je to gramnegativní tyčka, někdy obalená slizovou vrstvou. Běžně se nachází v odpadních vodách, v půdě či ve střevech. Je jedním z častých původců nozokomiálních nálezů, často kontaminuje například katétry, infuzní roztoky či dýchací přístroje. *Pseudomonas aeruginosa* infikuje zejména osoby, které mají sníženou imunitu například jako důsledek těžkého onemocnění, popálenin, užívání širokospektrých antibiotik či jsou z jiných důvodů imunosuprimované. Infekce popálenin jsou obzvlášť nebezpečné, často velmi rozsáhlé a spojené se septickým stavem. *Pseudomonas aeruginosa* dále může způsobovat například sepse novorozenců, závažné infekce oka či osteomyelitidy.

Patogenitu toho druhu ovlivňuje buněčná struktura a tvorba exolátů. *Pseudomonas aeruginosa* má v buněčné stěně lipopolysacharidový komplex, který tvoří specifický soubor protilátek. Ty spolu s extracelulárním polysacharidem alginátem buňku chrání před obranou hostitele. Z exolátů jsou důležité zejména proteolytické enzymy, hemoliziny a cytotoxin. Proteolytické enzymy štěpí fibrin, kolagen a elastin a narušují stěny kapilár, cytotoxin narušuje buněčnou stěnu (Votava a kol., 2003).

7.2 Mykotické infekce

K rozvoji sepsy může dojít také z mykotických infekcí. Mykotické infekce bývají oportunní, onemocnění se tudíž častěji objevuje u pacientů s oslabenou imunitou. Nejčastěji se jedná o systémové infekce způsobené kvasinkami, které mají velmi vysokou

mortalitu. Nejvýznamnějším původcem mykotické sepse je rod *Candida* (Zazula a kol., 2005; Rózsa a kol., 2017).

Kromě kandidémie způsobené rodem *Candida* může také dojít například k rozvoji systémové infekce způsobené rodem *Cryptococcus* – kryptokokóze (Zima a kol., 2013).

Tabulka 3: Původci mykotických sepsí – diagnostika
(zdroj: Votava a kol., 2010 – přepracováno z textu do tabulky)

Kmen	Agar	Kolonie	Další metody průkazu
<i>Candida albicans</i>	Sabouraudův agar	Smetanové bílé	Mikroskopie Test tvorby zárodečných klíčků Biochemie Auxanogramy a zymogramy Sérologie MALDI-TOF
	Krevní agar	Drobné Vůně po chlebě	
	Chromogenní agar	Různé barvy (dle výrobce)	
	Rýžový agar	Tvorba pseudomycelia a chlamydospor	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Sabouraudův agar Krevní agar Čokoládový agar Chromogenní agar	Mukózní, krémové	Biochemie Průkaz antigenu Barvení pouzder dle Burriho MALDI-TOF

7.2.1 *Candida albicans*

Candida albicans je nejvýznamnější a nejvíce patogenní kmen rodu *Candida*. V mikroskopu může mít různý vzhled podle prostředí, ve kterém se nachází, vliv má také například kultivační médium. Můžeme pozorovat oválné blastokonidie. Z blastokonidií pučí dceřinné buňky, které zůstávají spojeny, protahují se a tvoří pseudohyfy zaškrčené v místě spojení. Dále tvoří také kulaté tlustostěnné chlamydospory, které se zpravidla nachází na konci pseudohyf. Pro *Candidu albicans* je charakteristická tvorba zárodečných klíčků (tzv. germinace) pozorovatelná po tříhodinové inkubaci v séru při 37°C. Jedná se o tenké trubičkovité útvary, které pučí z blastokonidií a mohou z nich vznikat pravé hyfy. Germinace souvisí s virulencí a invazivitou kandidy, protože vláknitá forma lépe adhezuje a může prorůst do tkáně.

Candida albicans je velmi častým původcem kandidóz, které se obvykle projevují jako moučnivka – bílý povlak. Díky odolnosti vůči nízkému pH často způsobuje také vaginální kandidózu. Může se vyskytovat i u zdravých lidí, aniž by vyvolala infekci, jedná se tedy o oportunní patogen.

Kandidóza může být primární, způsobená obvykle infekcí virulentním kmenem, nebo sekundární, která může mít endogenní i exogenní příčiny. Endogenní příčiny

obvykle souvisí s oslabením imunity, kandidóza je typickým znakem defektu imunity. Exogenní příčiny souvisí často s léčbou oslabující imunitu (cytostatika, kortikosteroidy, imunosupresiva), zdrojem infekce může být také intravenózní katétr či kontaminovaný infuzní roztok (Bednář a kol., 1996, Votava a kol., 2003).

Kandidózy, které *Candida albicans* způsobuje, mohou být lokální, postihující zejména sliznici a kůži, a systémové. Systémovou kandidózu můžeme dále rozdělit na orgánovou, která postihuje zejména plíce, játra, slezinu, ledviny, oko, centrální nervovou soustavu a peritoneum, a diseminovanou, postihující jeden nebo více orgánů a spojenou s kandidémií. Akutní forma systémové kandidózy probíhá s klinickým obrazem septického stavu (Zazula a kol., 2005).

Systémové kandidózy jsou spíše vzácné, postihují zejména pacienty s oslabenou imunitou, poruchami hormonů či po chirurgických zákrocích nebo se zavedeným katétrem a nedonošené novorozence, mají však vysokou mortalitu (Votava a kol., 2010).

7.2.2 Ostatní Candidy

Kromě kmene *Candida albicans* způsobuje mykotickou sepsi ještě několik dalších druhů, označované jako *kandidy non-albicans*. Druhým nejčastějším původcem mykotických systémových infekcí je *Candida tropicalis*, která může způsobovat také infekce střev a dýchacího systému. Pro pacienty, kteří trpí leukémií či lymforetikulárními malignitami, je mnohem nebezpečnější patogen než *Candida albicans*. Dalším možným původcem mykotických systémových infekcí je *Candida parapsilosis* často kolonizující katetry a způsobující například endokarditidy, záněty zevního zvukovodu, septické artritidy nebo peritonitidy (Bednář a kol., 1996, Votava a kol., 2003, Votava a kol., 2010).

7.2.3 *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans patří mezi kvasinky rodu *Cryptococcus*, které se běžně vyskytují v půdě a trusu ptáků (zejména holubů) či v alkalických substrátech. Na rozdíl od rodu *Candida* netvoří pseudomycelia a některé kmeny jsou schopné tvořit mohutná polysacharidová pouzdra.

U zdravých osob může *Cryptococcus neoformans* vyvolávat primární mykózy, může však být i zdrojem sekundárních mykóz, a to u predisponovaných a oslabených osob.

Primárně infikuje plíce, kde vyvolává fatální pneumonie. Dále může způsobovat těžké meningitidy až sepse, u pacientů s AIDS je jedním z hlavních původců mykotických komplikací (Bednář a kol., 1996, Votava a kol., 2003).

7.3 Virové infekce

Virové infekce mohou být přímým původcem sepse, nebo mohou umožnit sekundární bakteriální sepsi. Původci se mohou lišit u novorozenecké sepse a sepse u dospělých. U novorozenců se jedná často o sepse způsobené enteroviry a virem herpes simplex, u menších dětí jsou častým původcem enteroviry a lidské parechoviry. Dalšími častými původci jsou virus horečky dengue, rhinoviry, chřipkové viry či respirační syncytiální virus. (Lin a kol., 2018)

Nejčastější příčinou virové sepse jsou pneumonie. Gu a kol uvádí jako virové původce sepse viry influenzy A a B, rhinoviry, parainfluenza viry, koronavirus, respirační syncytiální virus, enteroviry, adenoviry a lidský metapneumovirus. U imunokomprimovaných pacientů je častým původcem také cytomegalovirus. Kromě běžně detekovaných virů vzbuzují obavy také nově se vyskytující viry, které mohou způsobit sepsi. Jedná se zejména o viry SARS-CoV, MERS-CoV a SARS-CoV-2.

Byla také zjištěna interakce mezi bakteriálními a virovými infekcemi, která může zvyšovat riziko koinfekce. Jedná se zejména o interakce mezi virem chřipky a bakteriemi *Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus* (Gu a kol., 2020).

8 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA INFEKČÍ KREVNÍHO ŘEČIŠTĚ

Infekce krevního řečiště (IKR) jsou nebezpečné komplikace u pacientů na jednotkách intenzivní péče (Bharadwaj a kol., 2014).

Jedná se o stav, kdy proniknou mikroorganismy do krve, jsou životaschopné a tento průnik provází celkové známky infekčního procesu (Čermák a kol., 2008).

Sepse a IKR jsou často zaměňovány, nicméně jedná se o různé stavy. IKR odkazuje na přítomnost patogenu v krevním řečišti s příznaky infekce. Tento stav se může, ale i nemusí rozvinout v neregulovanou imunitní odpověď organismu a orgánovou dysfunkci – sepsi. Zároveň ne vždy je sepsa důsledkem IKR. Příznaky obou stavů jsou klinicky variabilní a nespecifické, stejně tak se liší i laboratorní diagnostika. Zatímco laboratorní diagnostika IKR je založena zejména na pozitivní hemokultivaci, v případě sepsy je její role více komplexní a využívá více biomarkery (Huerta a Rice, 2019).

8.1 Laboratorní diagnostika

Laboratorní diagnostika IKR zahrnuje několik různých metod. Na IKR mohou upozornit biochemické a hematologické ukazatele, jako je leukocytóza s posunem směrem k nezralým formám a přítomností nezralých forem a toxického zrnění neutrofilních segmentů, nižší hladiny železa v séru a vyšší hodnoty zánětlivých parametrů, nižší počet trombocytů, anémie, nízká koncentrace albuminu v krvi, hyponatrémie a hypofosfatémie.

Velmi důležitá je mikrobiologická diagnostika IKR. Existují metody založené na jednorázovém odběru krve, kontinuální separaci bakterií z krve pacienta či průkazu nukleových kyselin. Metody mikrobiologické diagnostiky se dělí na přímé a nepřímé. Mezi přímé patří mikroskopie, kultivace, imunochemické metody, genetické metody a chemické metody. Mikroskopie je rychlá metoda s nižší specifikou a senzitivitou, naproti tomu kultivace je specifická a senzitivní, ale pomalá. Imunochemicky se patogen detekuje na základě reakce antigenu se specifickou protilátkou (Čermák a kol., 2008).

Do popředí se dostávají molekulární metody diagnostiky, založené na průkazu nukleové kyseliny, většinou pomocí PCR. K použití v rutinní diagnostice se blíží také metody sekvenování (Idelevich a kol., 2018).

Využívanou metodou je také hmotnostní spektrometrie, která umožňuje rychlou a specifickou diagnostiku. Jedná se zejména o techniku MALDI-TOF. Velmi slibné je také spojení hmotnostní spektrometrie s PCR, které by umožnilo detekci patogenu přímo z klinického vzorku (Bharadwaj a kol., 2014).

Využitím chemických metod je možné prokázat chemické látky, které jsou specifické pro přítomnost daného organismu, například součást těla a produkty metabolismu. Přímé metody jsou v praxi nejvíce používané metody diagnostiky IKR, velmi důležitá je zejména hemokultivace, která je základem zejména diagnostiky bakteriálních a houbových původců IKR (Čermák a kol., Allerberger a Kern, 2020).

Nepřímé metody se používají nejčastěji k průkazu virů či parazitů, kde nelze patogen prokazovat přímou metodou – pokud je obtížná či nemožná kultivace. Metody jsou založeny zejména na stanovování protilátek, které jsou reakcí makroorganismu na přítomnost mikroorganismů. Mezi nepřímé metody patří různé typy stanovení protilátek, jako jsou například aglutinace, komplement-fixační reakce či imunochemické metody (Čermák a kol., 2008).

8.1.1 Mikrobiologická diagnostika založená na jednorázovém odběru krve

Pro tuto mikrobiologickou diagnostiku se odebírá zpravidla venózní krev, mimo jiné kvůli snazšímu odběru. Obvykle se nedoporučuje odběr z venózních katétrů, kvůli většímu riziku kontaminace. Krev by se měla odebírat co nejdříve po prvních příznacích infekce, před zahájením případné antibiotické terapie. Pro zvýšení pravděpodobnosti záchytu lze udělat více odběrů, tyto odběry je však nutné rozložit v čase (Čermák a kol., 2008).

8.1.1.1 Hemokultivace

Základní technologií diagnostiky IKR, zejména houbové a bakteriální, je hemokultivace. Je také důležitým předpokladem pro správnou a cílenou léčbu. Díky tomu je také možné snížit mortalitu či délku hospitalizace pacienta.

Hemokultury se začaly používat již v roce 1880, zpočátku se odebírala jen kapka krve z prstu. Vzhledem k tomu, že mikrobi jsou v krvi jen ve velmi malém množství, je

objem krve k jejich detekci velmi důležitý. K pokroku v tomto směru došlo s vynálezem sterilních jehel pro odběr krve v roce 1886, které umožnily odběr většího množství krve (Allerberger a Kern, 2020).

Aby bylo možné diagnostikovat přítomnost patogenů v krvi, je nutné dodržet několik zásadních požadavků pro odběr krve a kultivaci. Doporučuje se odebírat žilní krev z oblasti loketní jamky. Před odběrem krve je nutné správně a dostatečně vydezinfikovat oblast vpichu, aby se zabránilo kontaminaci. Zabránění kontaminace umožní správnější interpretaci výsledků a snižuje riziko vzniku antimikrobiální rezistence patogenů v důsledku nesprávné léčby. Wilson uvádí jako nejlepší desinfekci chlorhexidin, dále jodovou tinkturu a různé alkoholy, u dětí mladších než 2 měsíce doporučuje upřednostnit alkoholovou dezinfekci před chlorhexidinem (Wilson, 2020).

Relativně malé množství patogenů přítomných v krvi vyžaduje adekvátní objem odebrané krve. Zpravidla se u dospělých pacientů kultivuje objem 8 – 10 ml krve na hemokultivační lahvičku, tedy 16 – 20 ml krve na jeden standardní set (aerobní + anaerobní hemokultivační lahvička). U dětí od dvanácti let věku se odebírá stejný objem krve jako u dospělých, pro mladší pacienty existují pediatrické hemokultivační lahvičky, do kterých se odebírá menší objem krve.

Je vhodné odebírat více hemokultur, čímž se umožní přesnější diagnostika a odhalení případné kontaminace. Doporučuje se kultivovat ideálně 2 – 3 hemokultury (tedy 20 – 30 ml krve celkem) – aerobní, anaerobní a v případě predispozice pacienta k rozvoji mykotické či mykobakteriální IKR je vhodné kultivovat ještě jednu lahvičku. U pediatrických pacientů jsou IKR často způsobeny zejména aerobními bakteriemi, a proto mnohdy stačí kultivovat pouze aerobní hemokulturu. Stejně tak u dospělých pacientů, u kterých nelze odebrat dostatečné množství krve, se kultivuje pouze aerobní hemokultura.

Hemokultivační lahvičky by kromě kultivačního média měly obsahovat také antikoagulantia, aby se zabránilo sražení krve. Komerčně dostupné lahvičky zpravidla obsahují polyanetholsulfonát sodný.

V automatizovaných systémech se kultivuje obvykle 5 – 7 dní při teplotě 35 – 37°C, v některých případech se kultivace prodlužuje (např. u déle rostoucích bakterií). Wilson

však uvádí, že často je přítomnost mikroorganismu detekována do 72 hodin (Wilson, 2020; Scharfen, 2014).

Velký posun v oblasti hemokultivace nastal s rozvojem možností detekce kultivovaných mikroorganismů. V roce 1990 byl představen první plně automatizovaný systém BacT/Alert, založený na detekci mikroorganismů pomocí detekce změny pH a množství oxidu uhličitého spojené s růstem mikroorganismů. K měření sloužil senzor umístěný ve spodní části hemokultivační lahvičky. Později byl představen nový systém, který měřil změnu tlaku v hrdle lahvičky spojený s metabolismem mikroorganismů. Změnu měřil elektrickým tlakovým senzorem spojeným se septem lahvičky.

Byl představen také přístroj, který měří změny pH, oxidu uhličitého a redoxního potenciálu použitím přidané fluorescenční molekuly a detekci změny fluorescence. Tento přístroj však přestal být používán v roce 2004.

Velký pokrok nastal také v oblasti identifikace mikroorganismu po hemokultivaci, a to s představením možností identifikace pomocí molekulárně biologických metod založených na identifikaci nukleových kyselin či využitím hmotnostní spektrometrie (Allerberger a Kern, 2020).

8.1.1.2 MALDI-TOF

Využití hmotnostní spektrometrie k identifikaci patogenů v hemokulturách bylo navrženo již v 70. letech minulého století, nějakou dobu však trvalo, než se technologie vyvinula natolik, aby bylo možné ji využít k rutinním vyšetřením. Zásadním pokrokem byl zejména objev techniky založené na ionizaci laserem za účasti matrice. Tuto techniku objevili němečtí biofyzici Franz Hillenkamp a Michael Karas (Idelevich a kol., 2018; Patel, 2015).

Hmotnostní spektrometrie je metoda založená na ionizaci vzorku a separaci iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje. Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum, které vyjadřuje závislost intenzity iontového proudu na poměru hmotnosti a náboje (Klouda, 2016).

Název MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization – time of flight) odkazuje na konkrétní metodu ionizace a detekce. MALDI je metoda desorpce a ionizace analytu (v tomto případě mikroorganismu) za účasti matrice pomocí laseru. Matrice,

ve které je vzorek, absorbuje energii z laserového impulzu, čímž chrání analyt před fragmentací. Takto dochází k desorpci mikrobiálních molekul a molekul matrice a následně k ionizaci. Skrze náhodné kolize je náboj přenesen na analyt, který následně přechází do analyzátoru (Patel, 2015).

Analyzátozem je hmotnostní spektrometr s detektorem TOF (time of flight), jehož výhodou je rychlost a jednoduchost provedené analýzy. Všem iontům analytu se najednou dodá stejné množství energie. Ionty vstoupí do trubice, ve které je vakuum a na jejímž konci je detektor. Urychlené ionty se pohybují různou rychlostí v závislosti na hodnotě m/z , ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii se pohybují rychleji a dostanou se na detektor dříve (Klouda, 2016).

Výsledné hmotnostní spektrum je unikátní pro každý mikroorganismus, některé píky jsou však specifické pro určitý rod či druh. Spektrum se porovnává s databází spekter a podle toho se určí, o jaký mikroorganismus se s určitou pravděpodobností jedná (Patel, 2015).

Databáze je však omezená, protože neobsahuje spektra úplně všech mikroorganismů. Kvůli tomu může být problematická identifikace některých vzácněji se vyskytujících mikroorganismů. Velmi užitečná je proto možnost přidávat do databáze další spektra a tím ji rozšiřovat (Welker a kol., 2019).

Ačkoli je po průkazu pozitivní hemokultivace nutné mikroorganismus vyočkovat na kultivační médium, několik hodin kultivovat a až poté je možná identifikace pomocí MALDI-TOF, přesto urychluje diagnostiku až o 24 hodin (Patel, 2015).

Velkou výhodou je rychlost a přesnost identifikace. Metoda prošla poměrně rychlým vývojem a v současné době je její využití v mikrobiologických laboratořích standardních součástí rutinních vyšetření (Idelevich a kol., 2018).

Identifikace pomocí MALDI-TOF téměř nahradilo biochemickou identifikaci mikroorganismů, která je časově náročnější (Lamy a kol., 2020).

Stále však jsou oblasti, u kterých postupně dochází k optimalizaci. Jednou z oblastí je příprava vzorku zahrnující kultivaci a přenos vzorku z kultivačního média. Bylo prokázáno, že použité kultivační médium může mít vliv na účinnost identifikace. Pokud se však jedná o pevné kultivační médium, vyřeší tento problém simple washing steps.

Je-li však analyzovaný tekutý vzorek, vyžaduje příprava více kroků. Je nutné mít vzorek přečištěný, což obvykle vyžaduje kultivaci a filtraci. Současně je také potřeba inaktivovat buňky, protože v případě práce s mikroorganismy je zvýšené riziko biohazardu. Pokud je vzorek kultivovaný na pevném médiu, není obvykle další úprava nutná a lze identifikovat kolonii přímo. To se týká zejména bakterií. Například filamentózní houby a *Mykobacterium* spp. však úpravu vyžadují (Welker a kol., 2019; Hou a kol., 2019).

Všechny součásti je stále ještě nutné optimalizovat, ideálně směrem k automatizaci, která by umožnila přípravu a analýzu vzorku, který momentálně vyžaduje vzdělaný a zkušený personál (Welker a kol., 2019; Schubert a Kostrzewa, 2017).

Kromě automatizace je také snaha urychlit diagnostiku odstraněním nutnosti kultivace a možnosti diagnostiky z tekutého vzorku, jako je například pozitivní hemokultura. Možností rychlejší přípravy vzorku je centrifugace za nízkých otáček a lýza krevních buněk či průtoková cytometrie a centrifugace nejprve za nízkých a poté vysokých otáček v případě moči. Identifikovat mikroorganismy je také možné přímo ze vzorku mozkomíšního moku (Hou a kol., 2019; Tsuchida a kol., 2020).

Další problematikou je také databáze, která neobsahuje všechny mikroorganismy. Nejvíce omezená je databáze anaerobních bakterií. Databáze obvykle obsahuje zejména nejčastěji se vyskytující anaerobní bakterie. Je proto nutné databázi rozšiřovat. Jedním z možných řešení by byla online databáze mikroorganismů, kam by bylo možné nahrát, porovnávat a sdílet data. V praxi však toto naráží na řadu komplikací, jako je například ochrana soukromí a dat, nutnost přísného managementu kvality či odlišnost spekter v závislosti na podmínkách růstu mikroorganismu, přípravě vzorku či instrumentaci. Databázi je také nutno přizpůsobovat změnám taxonomie. Rozšiřování databáze je velmi důležité zejména v oblasti filamentózních hub (Welker a kol., 2019; Hou a kol., 2019).

Problémem MALDI-TOF je také nemožnost přesné identifikace mezi některými druhy, například odlišení *Shigella* a *E. coli*, *Bordetella pertussis* a *Bordetella bronchioseptica* či *Bacteroides nordii* a *Bacteroides salyersiae* (Hou a kol., 2019).

Řešila se také otázka využití MALDI-TOF k testům případné citlivosti na antimikrobiální látky. Ačkoli některé výzkumy v této oblasti byly úspěšné, je využití v praxi zatím nerealizovatelné. Zatím neexistuje postup, kterým by bylo možné

analyzovat klinicky významné kombinace antibiotik a mikroorganismů pouze za pomoci MALDI-TOF, nicméně vývoj takové technologie by znamenal významné urychlení diagnostiky (Welker a kol., 2019; Schubert a Kostrzewa, 2017).

8.1.2 Průkaz nukleových kyselin

Ačkoli jsou základem diagnostiky IKR hemokultivace, používají se i další metody. Včasná diagnostika je velmi důležitá, zlepšuje prognózu, snižuje mortalitu a umožňuje optimalizaci léčby. Proto je snaha ji ještě více urychlit. Hemokultivace totiž trvá relativně dlouho, navíc ne všechny patogeny lze kultivovat a mohou se vyskytovat také falešně negativní hemokultury.

Urychlování diagnostiky je možné zejména díky velkému rozvoji molekulárních metod, ke kterému došlo v posledních letech, a to zejména v oblasti izolace a amplifikace nukleových kyselin. Rozvíjí se zejména metody založené na PCR. Tento pokrok v molekulární biologii rozšiřuje možnosti detekce mikroorganismů (Opota a kol., 2015).

V současné době jsou dostupné čtyři typy molekulárních metod: metody založené na hybridizaci *in situ*, hybridizační technologie založené na DNA microarray, metody založené na amplifikaci nukleových kyselin a kombinované metody. Molekulární metody lze využívat k průkazu patogenu v pozitivní hemokultuře, v poslední době se však vyvíjí možnosti průkazu patogenu přímo z odebrané krve bez předchozí kultivace, což diagnostiku výrazně urychluje (Peker a kol., 2018).

Významné jsou také metody metagenomického sekvenování nové generace (mNGS, metagenomic next generation sequencing), které umožňují sekvenaci a přesnou identifikaci a taxonomické zařazení identifikovaného patogenu. mNGS je určeno zejména k využití při identifikaci virových patogenů. U mNGS jsou podobná preanalytická rizika a pravidla jako u hemokultur, jako je riziko kontaminace či nutnost vhodného objemu vzorku (pro mNGS se odebírá zpravidla méně než 1 ml krve). Analytická fáze zatím také není optimalizována, je také poměrně drahá pro rutinní použití. Hrozí také riziko kontaminace vzorku, metody často vyžadují sekvenovat separovanou DNA či RNA. Také databáze, se kterými se sekvenovaná nukleová kyselina porovnává, je zatím velmi omezená (Greninger a Naccache, 2019).

8.1.2.1 Průkaz patogenu v pozitivní hemokultuře

Patogeny z pozitivní hemokultury lze prokazovat různými typy molekulárních metod, které jsou založené na detekci úseků genomu, které mohou být více či méně specifické. (Čermák a kol., 2008)

Pro průkaz patogenu z hemokultury lze využít metody založené na hybridizaci *in situ*. Jedná se o metodu hybridizace dvou komplementárních úseků nukleových kyselin. Jedním úsekem je známá sekvence nukleových kyselin, druhým je úsek genomu neznámého mikroorganismu, který je identifikován na základě této hybridizace. Příkladem tohoto typu je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), při které se hybridizují fluorescenčně značené oligonukleotidy s ribosomální DNA bakterií či hub. Vizualizace se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Technologie DNA microarray je technika založená na imobilizaci úseků oligonukleotidů na pevném povrchu. Umožňuje paralelní detekci vícero různých patogenů, případně i jejich genů pro rezistenci na antimikrobiální látky.

Další možností identifikace patogenu z hemokultury jsou metody založené na amplifikaci nukleové kyseliny, nejčastěji pomocí PCR, a to jak širokospektré PCR, tak multiplex PCR. Používají se univerzální primery, které cílí na ribosomální DNA, identifikace mikroorganismu probíhá sekvenováním či pomocí genově/druhově specifické real-time PCR (rt-PCR). Multiplex PCR obvykle cílí na různé úseky chromozomů patogenů a zároveň umožňuje detekci genů pro rezistenci (Peker a kol., 2018).

Multiplex PCR a microarray jsou v poslední době používány zejména k identifikaci bakterií a hub z pozitivních hemokultur. Metody jsou však poměrně drahé, lze jimi detekovat pouze omezený počet patogenů a zpracovat jen málo vzorků současně (Lamy a kol., 2020).

Další metodou, kterou lze využít, je tzv. LAMP (loop-mediated isothermal amplification). Jedná se o jednokrokovou amplifikaci cílené sekvence DNA, která probíhá izotermicky, je velmi citlivá a méně ovlivněna přítomností inhibitorů v biologickém vzorku než PCR. Během amplifikace se čtyři nebo šest různých primerů navazuje na šest nebo osm různých oblastí genu, díky čemuž je reakce vysoce specifická. Zároveň LAMP nevyžaduje vysoce vybavenou laboratoř, a proto je možné metodu využívat

i v rozvojových zemích. Oproti PCR však nelze produkt reakce využít pro další molekulární metody (např. klonování) a je složitější vybrat vhodný úsek pro amplifikaci a syntetizovat primery. U LAMP je také větší riziko kontaminace než u PCR (Mori a Notomi, 2009; Wong a kol., 2018).

K identifikaci patogenu z pozitivní hemokultury se využívají také kombinované metody, které spojují výhody různých molekulárních metod (Peker a kol., 2018).

8.1.2.2 Průkaz patogenu v odebrané krvi

Molekulární diagnostika přímo z krve má mnoho výhod, jednou z největších je zkrácení času diagnostiky, protože není nutné čekat na pozitivní hemokulturu. Na hemokultivaci není závislá detekce ani identifikace patogenu. Zejména metody PCR jsou velmi citlivé, takže potenciálně může být tento způsob diagnostiky citlivější než hemokultivace. Navíc je na PCR potřeba menší množství krve než na hemokultivaci, což je užitečné u pacientů, u kterých nelze odebrat dostatek krve na hemokultivaci (např. pediatričtí pacienti). PCR je také méně ovlivněna antimikrobiální léčbou. Výhodou je také možnost kvantitativní rt-PCR, která usnadňuje diagnostiku polymikrobiálních infekcí.

S citlivostí metody PCR je však spojeno větší riziko kontaminace vedoucí k falešně pozitivním výsledkům. Kontaminace může vzniknout například vlivem volně cirkulující buněčné DNA mrtvé bakterie či houby (bez přítomnosti infekce), přítomností patogenní DNA, která se uvolní působením imunitního systému na patogen či díky úspěšné antimikrobiální terapii, která v krvi nějakou dobu přetrvává (Opota a kol., 2015; Idelevich a kol., 2018).

Mohou také vzniknout falešně negativní výsledky, a to například vlivem interference nemikrobiální DNA s primery či přítomností inhibitorů (Idelevich a kol., 2018).

Patogeny z krve lze pomocí metody PCR diagnostikovat během amplifikace nukleové kyseliny či po ní. K identifikaci během amplifikace lze využít například multiplex rt-PCR. Identifikace patogenu po amplifikaci je většinou metoda PCR spojena s detekční metodou, kterou může být například sekvenování, elektroforéza na agarovém gelu či hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrorejem.

Molekulárními metodami lze citlivě a specificky detekovat také rezistenci na antimikrobiální látky, ale pouze v případě, že je jen jeden mechanismus rezistence (Opota a kol., 2015).

Využití multiplex PCR je omezeno pouze na identifikaci těch patogenů, které jsou častými původci IKR. Pro některé mikroorganismy také může mít nižší citlivost. Jedná se například o koaguláza negativní stafylokoky a nehemolytické streptokoky, které jsou často přítomné na kůži (Idelevich a kol., 2018).

Molekulární diagnostika však nemůže plně nahradit hemokultivaci. Ačkoli je rychlejší a umožňuje dřívější cílenou antimikrobiální terapii, nemá prokázaný efekt na mortalitu. Vyžaduje také vyšší vzdělání personálu laboratoře. Výhodou diagnostiky založené na identifikaci nukleové kyseliny však je větší rychlost než hemokultivace a možnost identifikace patogenu i během antibiotické léčby (Lamy a kol., 2020).

8.1.3 Další metody

Další možnou metodou je použití elektrochemického biosenzoru k detekci ribosomální RNA u bakterií s využitím elektrod. Biosenzory převádí chemické informace, jako je například koncentrace či analýza součástí vzorku, na signál, který je analyticky využitelný. Ribosomální RNA je u bakterií detekována amperometricky. Tato metoda umožňuje rychlou identifikaci neznámé bakterie ze vzorku krve či z pozitivní hemokultury. Lze takto detekovat také viry a protozoa, prokazuje se však přítomnost jiných součástí organismu. Jedná se o citlivou metodu molekulární diagnostiky (Gao a kol., 2017; Cesewski a Johnson, 2020).

8.2 Virové infekce

Virémie je IKR způsobená virem, který má dostatečnou virulenci a infekční dávku, aby překonal imunitní systém. Virus se dostává do krve přes lymfatické uzliny, stav se projevuje zvýšenou teplotou až horečkou. V krvi jsou viriony fagocytovány. Pokud však dojde k překročení kapacity fagocytárního systému, dostává se infekce do orgánů, viriony mohou vyvolávat systémové infekce a vzniká tzv. sekundární virémie. V případě, že virémie přetrvává, nedochází k jejímu zhoršování, ale imunitní systém není schopen ji eliminovat, jedná se o tzv. chronickou perzistující infekci.

Častými původci virémie jsou zejména virus HIV, cytomegalovirus a virus Epstein-Baarové, dále také enteroviry, virus dengue, virus vztekliny, viry hepatitidy či virus lymfocytární choriomeningitidy.

Pro diagnostiku virémie se odebírá nesrážlivá krev do EDTA pro průkaz antigenů, prokazují se také protilátky v séru. Jako pomocná vyšetření mohou sloužit vyšetření aminotransferáz, krevní obraz a sedimentace, stanovení CRP a PCT (Zima, 2013).

K diagnostice virémie lze použít také mNGS, které umožňuje sekvenování přímo z krve. Tímto způsobem lze identifikovat například viry hepatitid. Sekvenováním lze také zjistit příčinu u horečky neznámého původu či virových hemoragických horeček, které mohou být způsobeny například virem Ebola, Zika, dengue či lidskými herpesviry (Greninger a Naccache, 2019).

8.3 Bakteriální infekce

Přítomnost bakterií v krevním řečišti se nazývá bakteriémie. Bakteriémie můžeme rozdělit na primární a sekundární. Jako primární bakteriémie se označuje infekce, u které není známý zdroj, sekundární bakteriémie ukazuje na šíření infekce z jiného, primárního zdroje. Velkým rizikem vzniku IKR jsou zavedené žilní katétry (Zima, 2013).

Původci bakteriálních IKR jsou podle studie, kterou provedli Laufariel a kol. v roce 2020, ve většině případů fakultativně anaerobní bakterie, méně často obligátně aerobní a aerobní bakterie. Z fakultativně anaerobních bakterií se jedná o koaguláza negativní stafylokoky, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli* a *Klebsiella spp.*, z obligátně aerobních *Pseudomonas spp.* a *Acinetobacter spp.* Ze striktně anaerobních původců byly nejčastěji zachyceni *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.* a *Clostridium sordelii* (Lafaurie a kol., 2020).

Ze studie z roku 2015 vyšly jako nejčastější anaerobní původci bakteriální IKR také *Bacteroides spp.* a *Fusobacterium spp.*, dále také *Clostridium spp.* a *Propionibacteria spp.* (Ng a kol., 2015).

Základem diagnostiky bakteriálních IKR je hemokultura, která je také předpokladem pro cílenou léčbu. Rozvíjí se také možnosti diagnostiky přímo z krve molekulárními metodami, díky kterým by potenciálně mělo být možné určit bakteriální

rezistenci, nicméně v rutinní praxi tyto metody zatím nejsou příliš časté (Allerberger a Kern, 2020).

K identifikaci bakterie z pozitivní hemokultury lze využít biochemické testy, hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF či molekulární metody. Lze využít PCR či sekvenování založené na amplifikaci nukleové kyseliny, nebo hybridizační metody či DNA microarray, které na amplifikaci nukleové kyseliny založeny nejsou a nejsou tudíž ovlivněny případnou přítomností inhibitorů či kontaminací. Hybridizace a microarray však vyžaduje větší množství bakterií (Opota kol., 2015b).

8.4 Mykotické infekce

Mykotické infekce jsou spíše oportunní infekce, které se klinicky projevují u imunosuprimovaných pacientů. Nejvíce nebezpečné jsou invazivní a systémové infekce. Ze systémových infekcí se vyskytují zejména kandidózy, mohou se však objevit také kryptokokózy či aspergilózy. Systémové kandidózy jsou velmi časté IKR zejména u pacientů na jednotkách intenzivní péče a mají nejvyšší mortalitu.

Rizikem pro rozvoj mykotické IKR jsou katétry, imunosupresivní léčba po transplantaci, úplná parenterální výživa či dlouhodobá léčba širokospektrými antibiotiky. Mezi další faktory, které mohou mít vliv na rozvoj mykotické infekce patří například umělá plicní ventilace, léčba kortikosteroidy, dlouhodobý pobyt pacienta na jednotce intenzivní péče či selhání ledvin nebo jater (Zazula a kol, 2005).

Stejně jako u bakteriálních je i u mykotických IKR základem diagnostiky hemokultura, následovaná identifikací patogenu. Lze využít kultivační chromogenní média nebo čokoládový agar pro záchyt kvasinek, základní kultivační agar pro mykologickou diagnostiku je Sabouradův agar. Je také možné prokazovat houbové antigeny a detekovat protilátky, zejména metodami na principu ELISA (Ellepola a Morrison, 2005; Cercenado, 2017; Votava a kol., 2010).

Kromě kultivace lze použít také molekulární metody založené na amplifikaci nukleové kyseliny, jako například rt-PCR. K identifikaci některých kvasinek lze využít také hybridizaci *in situ*, tato metoda je však omezena pouze na několik málo druhů (Cercenado, 2017).

8.5 Parazitární infekce

Přítomnost parazitů v krevním řečišti se nazývá parazitémie. Krev může být prostor lokalizace parazitů, mohou ji využívat k transportu po organismu do orgánů či k přenosu mezi organismy. Množství parazitů v krvi nemusí být stálé, může se měnit v průběhu dne či narůstat s progresí onemocnění (Zima, 2013).

Častými původci těchto IKR jsou protozoa plasmodia, trypanozomy, babesie, leishmanie a schistosomy a filárie – helminti způsobující filariózy (Zima, 2013; Votava a kol., 2010).

Obvykle se vyšetřuje periferní krev, ne vždy však lze prokázat přítomnost parazitů. Plasmodia, babesie či trypanozomy se obvykle prokazují z krve mikroskopicky, průkazem protilátek (trypanozoma) či DNA (plasmodia, babesie). Naproti tomu leishmanie či schistosomy v periferní krvi obvykle nelze nalézt, proto se prokazují kultivací a histologicky z punktátu a mikroskopicky z nátěru kostní dřeně, lymfatických uzlin, sleziny a jater (leishmanie) či sérologicky průkazem protilátek (leishmanie, schistosomy). Často k identifikaci napomáhá vyšetření parametrů krevního obrazu, kde zpravidla dochází ke změnám v důsledku parazitární infekce, jako je například leukopenie, trombocytopenie, anémie, pancytopenie či eozinofilie (Zima, 2013).

K mikroskopickému vyšetření periferní krve slouží dvě metody: tlustá kapka a tenký roztěr. Obě vyšetření se dělají z krve odebrané z bříška prstu a barví se dle Giemsy-Romanowského.

Při vyšetření metodou tlusté kapky se používá třetí až čtvrtá kapka, která se kápne doprostřed podložního skla, roztáhne se rohem jiného skla ve skvrnu a nechá se zaschnout. Barví se 20 minut bez předchozí fixace dle Giemsy-Romanowského. Při oplachu barvy je nutné postupovat zvlášť opatrně vzhledem k tomu, že nátěr se před barvením nefixuje. Metoda tlusté kapky slouží spíše jako orientační vyšetření přítomnosti parazitů v krvi.

Pro tenký roztěr se kápne malá kapka krve na úzký okraj sklíčka, roztáhne se do krevního roztěru a nechá uschnout. Barví se také dle Giemsy-Romanowského, je však potřeba preparát fixovat methanolem a barví se o něco déle (30 – 40 minut). Tenký roztěr umožňuje podrobnější určení druhu a stádia parazita, pokud se jedná o parazita

vyskytujícího se v erythrocytech, počítá se parazitémie – procento infikovaných erythrocytů (Votava a kol., 2010).

Mikroskopie je standardem pro diagnostiku například malárie, ačkoli vyžaduje personál zkušený v této diagnostice. Malárii však lze diagnostikovat také pomocí PCR metod či rychlých diagnostických testů (RDT, rapid diagnostic test) (Sun a kol., 2019; Mayta a kol., 2019).

RDT je jednoduchý imunochromatografický test, kterým lze v krvi prokázat přítomnost specifických antigenů v tomto případě parazitů způsobujících malárii. Test je založen na tvorbě komplexů antigen-protilátka, jedná se o test kvalitativní (Obeagu a kol., 2018).

RDT je poslední dobou k diagnostice malárie využíváno častěji, naproti tomu PCR příliš často využíváno není. Lze ji však využít například k diagnostice *Trypanosoma cruzi*, která v mikroskopu nemusí být viditelná. Diagnostikuje se proto hlavně sérologicky, průkazem protilátek, lze ale využít také kvantitativní PCR. U této metody je však problematická extrakce DNA, kvůli čemuž hrozí větší riziko kontaminace (Sun a kol., 2019; Mayta a kol., 2019).

Na IKR způsobenou plasmodii může ukazovat také krevní obraz, kde dochází ke změnám v diferenciálním rozpočtu leukocytů a posunu k mladším vývojovým formám (Sun a kol., 2019).

9 DOPORUČENÉ POSTUPY A TERAPIE

Vzhledem k tomu, že většina sepsí je způsobena bakteriemi, je doporučeno co nejdříve zahájit léčbu širokospektrými antibiotiky. Čím později je léčba zahájena, tím se zvyšuje riziko progresu sepse do septického šoku a mortalita, a to až o 7,6 % s každou hodinou. Zároveň se doporučuje identifikovat přesného původce sepse, aby bylo možné léčbu optimalizovat a následně nasadit cílená antibiotika. Cílená antibiotická léčba snižuje riziko superinfekce, toxicitu a cenu léčby a zároveň snižuje rozvoj antimikrobiální rezistence (Rello a kol., 2017; Lam a kol., 2017; Evans, 2018).

Lee a Levy uvádí, že dosud neexistuje specifická molekulární léčba, která by byla efektivní v léčbě sepse. Doporučují změřit hladinu laktátu v séru, odebrat krev na hemokulturu, začít léčbu širokospektrými antibiotiky, při hypotenzi či hladině laktátu ≥ 4 mmol/l podat fyziologického roztoku, při přetrvávající hypotenzi podat vazopresory (Lee a Levy, 2019).

V současné době se doporučuje jako první podávat při septickém šoku noradrenalin, který je případně možné doplnit o vazopresin. Naopak nedoporučuje se podávat dopamin, kromě bradykardických pacientů, u kterých je nízké riziko tachyarytmie. Vazopresory však mohou mít také nežádoucí účinky, včetně orgánové dysfunkce, vyšší užívání katecholaminů zvyšuje riziko atriální fibrilace (Perner a kol., 2016; Lam a kol., 2017).

V prvních hodinách hospitalizace pacienta v nemocnici je doporučeno měřit hladinu laktátu, tlak, diurézu a saturaci kyslíkem (Rello a kol., 2017).

Doporučuje se adekvátní doplnění kyslíku, aby se udržela saturace kyslíkem na 95 %. Při poklesu saturace pod 70 % může pomoci podání transfuze (Evans, 2018; Rello a kol., 2017).

Je standardním postupem podat pacientům se sepsí intravenózně fyziologický roztok. U pacientů se sepsí je nutné sledovat také tekutinovou bilanci a monitorovat množství vyloučené moči. Je vhodné udržovat koncentraci glukózy v krvi do 10 mmol/l, nedoporučuje se však striktně hlídat a udržovat nižší koncentraci kvůli riziku rozvoje hypoglykémie (Evans, 2018; Lam a kol., 2017).

Pokud to stav pacienta vyžaduje, je nutné podpořit funkci životně důležitých orgánů, a to zejména ledvin a plic. U ledvin hrozí rozvoj život ohrožujících komplikací, jako je například metabolická acidóza či hyperkalémie, u plic je žádoucí předejít rozvoji ARDS. Plicní ventilace umožňuje této komplikaci předejít a zvýšit tak šanci na přežití (Lam a kol., 2017).

Rychlé nasazení širokospektrých antibiotik, které výrazně snižuje mortalitu, se naopak nedoporučuje u virových sepsí, u kterých je neefektivní. Znalost potenciálního virového původce otevírá možnosti léčby vhodnými antiviroty. Léčba sepse zaměřená na specifické viry se dosud vyvíjí. Bylo vyvinuto mnoho antivirotik, ale žádné nebyly testovány specificky pro léčbu sepse. Některá antivirotika lze využít také například k prevenci reaktivace cytomegaloviru (Lina kol., 2018).

V případě podezření na herpetickou infekci se doporučuje podávat acyclovir (Kolář, 2016).

9.1 Potenciální léčba

V poslední době probíhá také výzkum potenciálních nových možností léčby, zaměřující se na různé faktory v patofyziologii sepse.

Jedna z možností, jak zabránit zánětlivé reakci, je podání polymyxinu B, který neutralizuje cirkulující lipopolysacharidy vyvolávající zánět. Zároveň je však velmi toxický, proto se může podávat pouze při filtraci krve na mimotělním oběhu (Heming a kol., 2016).

Další zkoumané možnosti léčby souvisí s imunoterapií. Jedna z možností je podání imunostimulačního agens – GM-CSF. Je však nutné ho podat ve fázi, kdy je imunitní systém pacienta paralyzovaný. Nebyl však objeven spolehlivý biomarker, který by tuto fázi přesně určil. Dále je potenciálně možná také cílená imunoterapie, která zahrnuje anti-cytokiny, monoklonální protilátky bránící faktorům virulence (například protilátky proti bakteriálním endotoxinům či lipopolysacharidům) nebo antikoagulancia.

Je doporučeno podat hydrokortizon, pokud se u pacienta nedaří dosáhnout hemodynamické stability jinými prostředky. Hydrokortizon má pozitivní vliv na hemodynamiku a zároveň nemá imunosupresivní účinky. Nebylo však prokázáno,

že by měl výrazný vliv na snížení mortality u pacientů se sepsí (Heming a kol., 2016; Lee a Levy, 2019).

Existuje několik dalších potenciálních léčiv, která by mohla být účinná v léčbě sepse, zatím jsou však teprve ve fázi klinického výzkumu. Jedná se například o lék levosimendan, který zvyšuje citlivost buněk myokardu na vápenaté ionty, trombomodulin, který aktivuje protein C a tím snižuje trombinem zprostředkovanou koagulaci, či beta-blokátory, které by mohly regulovat metabolické, kardiovaskulární a imunitní změny a změny hemostázy, které sepse vyvolává (Heming a kol., 2016).

Mezi slibné cíle pro léčbu virových infekcí patří ligand programované smrti, který vyvolává apoptózu aktivovaných T-lymfocytů a tím přispívá k rozvoji imunosupresivní fáze sepse, a také dysfunkce endotelové bariéry. K podpoře zachování integrity endotelu lze využít i některé z těchto látek, která mají pozitivní vliv na léčbu sepse, jako jsou statiny či blokátory angiotensinových receptorů (Lin a kol., 2018).

10 PREVENCE

Základem prevence je zejména zabránění rozvoje nozokomiální sepse, u které jsou velkým rizikem zejména multirezistentní bakterie. Může se jednat například o nozokomiální pneumonie, které se zpravidla rozvíjí během 2 – 3 dnů po intubaci, či katérové sepse. Katérové sepse mají nejhorší prognózu, systémovou infekci může zpomalit vyjmutí katétru, ale zpravidla se nezlepšuje s podáním antibiotik.

Obecně největším rizikem jsou zavedené kanyly, katétrů či jiné předměty, které mohou být kontaminované. Dalším zdrojem infekce může být také kontaminovaná infuze.

Základem prevence nozokomiální sepse je aseptický postup např. při zavádění kanyl či katétrů, použití ochranných pomůcek, školený personál, dezinfekce před zavedením kanyly či katétru a dezinfekce rukou zdravotnického personálu (Streitová a kol., 2015).

Nozokomiální a jiné infekce se mohou také rozvinout z traumat či popálenin. Základem prevence rozvoje infekce je dezinfekce rány a okolí, doporučuje se chlorhexidin. Dále je možná také antibiotická profylaxe (Ma a kol., 2016).

11 DISKUZE A ZÁVĚRY

Septické stavy vážně ohrožují život pacienta. Problematika definice byla prodiskutována a upravena v rámci konsenzuálních konferencí, které zavedly novou definici sepse.

Septické stavy mají různorodé laboratorní a klinické známky. Klinické známky mohou být spojeny s mikrobiálním původcem sepse. Velkým problémem je zejména fakt, že klinické známky sepse jsou nespecifické, což komplikuje diagnostiku septického stavu. Zásadní je zavedení diagnostického skóre SOFA z roku 1994, které sleduje změny v oblasti respirace, nervového systému, kardiovaskulárního systému, jater, koagulace a ledvin. Na základě těchto změn je možné monitorovat stav pacienta, stupeň orgánové dysfunkce a její případné zhoršení. Kvůli komplexnosti tohoto skóre, nedostatku dat u mnoha pacientů a obavám z pozdní identifikace septického stavu je však SOFA nepraktické v klinické praxi. Z tohoto důvodu bylo zavedeno qSOFA – zjednodušené a modifikované SOFA skóre založené pouze na třech kritériích. Kritéria se týkají alterace vědomí, dechové frekvence a systolického krevního tlaku, přítomnost alespoň dvou ukazuje na orgánovou dysfunkci. Zjednodušené skórování je však také kritizováno, protože může být v časném stádiu sepse málo citlivé, nižší citlivost se může vyskytovat také u některých pacientů (např. u pacientů s pneumonií či u hematologických pacientů).

Co se týče laboratorních známek, Sigel a Cerra definovali v roce 1979 čtyři stádia, charakterizované hemodynamickými a metabolickými změnami. Tyto změny ovlivňují také klinickobiochemické parametry. Rozdělení však vyžaduje průběžné měření parametrů, v praxi se proto příliš nevyužívá. V laboratorním obrazu se projevují zejména změny metabolismu, spotřeby kyslíku, ventilace, změny glykémie, počtu leukocytů a změny v hemokoagulačním systému.

Pro diagnostiku sepse jsou velmi důležité biomarkery, a to i přesto, že samy o sobě k diagnostice sepse nestačí. Mezi základní požadavky na vhodný biomarker patří rychlý vzestup hladiny při rozvoji sepse a pokles při účinné terapii a možnost snadného a citlivého stanovení. Mezi nejstudovanější biomarkery patří CRP a PCT. Dalšími biomarkery jsou IL-6, laktát, parciální tlak oxidu uhličitého, který je důležitý pro prognózu rozvoje septického šoku, a MR-proADM, který je zejména ukazatelem

prognózy. Stanovování biomarkerů výrazně usnadnil a zlepšil rozvoj metod molekulární biologie a stanovování pomocí hmotnostní spektrometrie. Nadále je snaha studovat nové biomarkery, které jsou zpravidla navrhovány díky jejich přínosu v diagnostice či určení prognózy sepse. Velká část těchto potenciálních biomarkerů však stále není dostatečně klinicky prostudována.

Nejčastějšími původci sepse jsou grampozitivní a gramnegativní bakterie. Jako nejčastější bakteriální původce uvádí mnohé studie zejména rody *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* a *Pseudomonas aeruginosa*. Další uvádění častí původci se u autorů studií liší. Příčinou sepse mohou být také polymikrobiální či anaerobní infekce.

Mohou se vyskytovat také sepse mykotické, způsobené zpravidla kvasinkami, a to zejména rody *Candida* či *Cryptococcus*.

Vzácně se vyskytují také sepse virové. Viry mohou být přímým původcem, nebo mohou umožňovat sekundární bakteriální sepsi. Co se častých původců týče, autoři se na rozdíl od bakteriálních sepsí shodují, původci bývají odlišní u dětí a u dospělých. Obavy vzbuzují nově se vyskytující viry a také zjištěná interakce s bakteriálními původci infekcí, která přináší riziko koinfekce. Problematikou virových sepsí a důvodem jejich vzácného výskytu jsou nejasná kritéria diagnostiky.

Infekce krevního řečiště lze diagnostikovat různými metodami. Základem je hemokultivace, která patří mezi metody založené na jednorázovém odběru krve. Hemokultivací lze prokázat zejména bakteriální či mykotické IKR. V poslední době se velmi rozvíjí metody molekulární biologie, zejména metody založené na průkazu nukleových kyselin. Mezi tyto metody patří hybridizace *in situ* a DNA microarray, kterými je možné diagnostikovat zejména bakteriální původce IKR, a metoda PCR, důležitá pro diagnostiku bakteriálních, mykotických a virových původců IKR. Rozvíjí se také metody sekvenování, zejména v souvislosti s diagnostikou virů. Sekvenování a PCR urychlují diagnostiku, protože je díky nim možné diagnostikovat patogeny přímo z krve bez nutnosti kultivace. Metody molekulární biologie jsou však většinou relativně drahé a vyžadují specializovanou laboratoř, usnadňují však zejména identifikaci mikroorganismů, které nelze kultivovat.

V případě pozitivní hemokultury je možné patogen identifikovat pomocí PCR či hmotnostní spektrometrií, velmi důležitý je zejména MALDI-TOF.

Další možností diagnostiky IKR je využití metody LAMP, která nevyžaduje vysoce specializovanou laboratoř, nicméně je zde větší riziko kontaminace než například u PCR a komplikovanější syntéza primerů. Dále lze využít také elektrochemické biosenzory, které jsou velmi citlivé a umožňují detekovat viry, bakterie a protozoa z pozitivní hemokultury či přímo z krve.

Kromě těchto metod lze některé původce IKR prokazovat imunologickými metodami, jako je průkaz antigenu či protilátek například metodou ELISA u mykotických infekcí či průkaz antigenu u virových původců. V případě diagnostiky parazitárních IKR je zásadní mikroskopie, dále lze využít rychlý diagnostický test. Naopak PCR se pro průkaz parazitárních původců IKR spíše nevyužívá.

Mezi doporučené postupy a terapie patří odběr krve na hemokultivaci, okamžité zahájení léčby širokospektrými antibiotiky, identifikace patogenu a změna léčby širokospektrými antibiotiky na léčbu cílenými antibiotiky. Dále je doporučeno podání fyziologického roztoku a podpora životních funkcí pacienta. Pacientův stav je nutno monitorovat a případně podávat vhodné prostředky směřující ke zlepšení stavu. V těchto základních doporučených postupech se autoři shodují. Nasazení širokospektrých antibiotik je však nevhodné, pokud se jedná o sepsi způsobenou virovým původcem.

V poslední době je také snaha vyvinout novou, cílenou léčbu septických stavů. Mezi potenciální léčiva patří levosimendan, trombomodulin či beta-blokátory, tyto možnosti léčby septických stavů jsou však zatím ve fázi klinického výzkumu. Pro léčbu virových septik je slibným cílem ligand programované smrti.

Prevence septických stavů je založena zejména na prevenci vzniku nozokomiálních septik. Velkým rizikem jsou zejména zavedené katétry či kanyly, kontaminované infuze či předměty. Důležitý je proto aseptický postup při zavádění, dezinfekce a používání ochranných pomůcek. V některých případech lze také využít antibiotickou profylaxi.

12 SEZNAM ZKRATEK

zkratka	význam zkratky	český význam
ADM	<i>Adrenomedullin</i>	
ALT	<i>Alaninaminotrasferasa</i>	
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>	Syndrom akutní dechové tísně
CARS	<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i>	Syndrom kompenzační protizánětlivé odpovědi
CRP	<i>C-Reactive Protein</i>	C-reaktivní protein
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>	
DIC	<i>Disseminated intravascular coagulation</i>	Diseminovaná intravaskulární koagulace
ESI	<i>Electrospray ionization</i>	Ionizace elektrosprejem
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>	Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen</i>	
IKR	<i>Infekce krevního řečiště</i>	
IL-1	<i>Interleukin 1</i>	
IL-6	<i>Interleukin 6</i>	
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>	Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace – Analyzátor doby letu
MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>	
mNGS	<i>Metagenomic Next Generation Sequencing</i>	Metagenomické sekvenování nové generace
MODS	<i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i>	Syndrom multiorgánové dysfunkce
MOF	<i>Multiorgan failure</i>	Syndrom multiorgánového selhání
MR-proADM	<i>Mid regional pro-adrenomedullin</i>	Proadrenomedullin
MS	<i>Mass Spectrometry</i>	Hmotnostní spektrometrie
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	Nukleární magnetická rezonance

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Polymerázová řetězová reakce
PCT	<i>Procalcitonin</i>	
qSOFA	<i>Quick Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment</i>	
RDT	<i>Rapid diagnostic test</i>	
rt-PCR	<i>Real Time PCR</i>	
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>	
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>	
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrom</i>	Systémová zánětlivá reakce
SOFA	<i>Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment</i>	
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>	Tumor nekrotizující faktor alfa

13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AJITH KUMAR, AK. Adrenomedullin in Sepsis: Finally, a Friend or an Enemy? *Indian J Crit Care Med.* 2020 Dec;24(12):1151-1153.

ALLERBERGER, Franz, KERN, Winfried V. Bacterial bloodstream infection. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Feb;26(2):140-141.

ANGUS, Derek C, VAN DER POLL, Tom. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013 Aug 29;369(9):840-51. doi: 10.1056/NEJMra1208623. Erratum in: *N Engl J Med.* 2013 Nov 21;369(21):2069.

BEDNÁŘ, Marek et al. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie.* Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996. 558 s. ISBN 80-238-0297-6.

BHARADWAJ, Renu, BAL, Abhijit, KAPILA, Ketoki, MAVÉ, Vidya, GUPTA, Amita. Blood stream infections. *Biomed Res Int.* 2014;2014:515273.

BHATTACHARJEE, Poushali, EDELSON, Dana P., CHURPEK, Matthew M. Identifying Patients With Sepsis on the Hospital Wards. *Chest.* 2017 Apr;151(4):898-907.

CANDEL, Francisco Javier, BORGES SÁ, Marcio, BELDA, Sylvia, BOU, Germán, DEL POZO, José Luis, ESTRADA, Oriol, FERRER, Ricard, GONZÁLEZ DEL CASTILLO, Juan, JULIÁN-JIMÉNEZ, Agustin, MARTÍN-LOECHES, Ignacio, MASEDA, Emilio, MATESANZ, Mayra, RAMÍREZ, Paula, RAMOS, José Tomás, RELLO, Jordi, SUBERVIOLA, Borja, SUÁREZ DE LA RICA, Alejandro, VIDAL, Pablo. Current aspects in sepsis approach. Turning things around. *Rev Esp Quimioter.* 2018 Aug;31(4):298-315. Epub 2018 Jun 25.

CERCENADO, Emilia. Utility of rapid microbiological techniques for the diagnosis of severe infections. *Rev Esp Quimioter.* 2017 Sep;30 Suppl 1:52-55. PMID: 28882017.

CESEWSKI, Ellen, JOHNSON, Blake N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosens Bioelectron.* 2020 Jul 1;159:112214. doi: 10.1016/j.bios.2020.112214. Epub 2020 Apr 12.

ČERMÁK, Pavel a kol. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště.* Praha: Maxdorf, ©2008. 182 s. Jessenius. ISBN 978-80-7345-142-4.

ČERNÝ, Vladimír et al. Sepse v intenzivní péči: vybraná doporučení v diagnostice a terapii. 2., rozš. vyd. Praha: Maxdorf, ©2005. 212 s. Intenzivní medicína; sv. 3. ISBN 80-7345-054-2.

ELLEPOLA, Arjuna N, MORRISON, Christine J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol. 2005 Feb;43 Spec No:65-84. PMID: 15765060.

EVANS, Tom. Diagnosis and management of sepsis. Clin Med (Lond). 2018 Mar;18(2):146-149.

FAIX, James D. Biomarkers of sepsis. Crit Rev Clin Lab Sci. 2013 Jan-Feb;50(1):23-36.

FAN, Shu-Ling, MILLER, Nancy S., LEE, John, REMICK, Daniel G. Diagnosing sepsis – The role of laboratory medicine. Clin Chim Acta. 2016 Sep 1;460:203-10.

GAO, Jian, JEFFRIES, Lindsie, MACH, Kathleen E, CRAFT, David W, THOMAS, Neal J, GAU, Vincent, LIAO, Joseph C, WONG, Pak Kin. A Multiplex Electrochemical Biosensor for Bloodstream Infection Diagnosis. SLAS Technol. 2017 Aug;22(4):466-474. doi: 10.1177/2211068216651232. Epub 2016 May 25.

GRENINGER, Alexander L, NACCACHE, Samia N. Metagenomics to Assist in the Diagnosis of Bloodstream Infection. J Appl Lab Med. 2019 Jan;3(4):643-653.

GU, Xiaoying, ZHOU, Fei, WANG, Yeming, FAN, Guohui, CAO, Bin. Respiratory viral sepsis: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and treatment. European Respiratory Review [online]. 2020, 29(157) [cit. 2021-04-26]. ISSN 0905-9180. DOI: 10.1183/16000617.0038-2020. Dostupné z: <https://err.ersjournals.com/content/errev/29/157/200038.full.pdf>

HOLUB, M. Definice sepse a septického šoku. Klinická biochemie a metabolismus [online]. 2018, 26(47), 76-78 [cit. 2021-05-01]. ISSN 2570-9402. Dostupné z: https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2019/10/KBM_2_2018-Holub-76.pdf

HOU, Tsung-Yun, CHIANG-NI, Chuan, TENG, Shih-Hua. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. J Food Drug Anal. 2019 Apr;27(2):404-414.

HUERTA, Luis E, RICE, Todd W. Pathologic Difference between Sepsis and Bloodstream Infections. J Appl Lab Med. 2019 Jan;3(4):654-663.

IDELEVICH, Evgeny A, REISCHL, Udo, BECKER, Karsten. New Microbiological Techniques in the Diagnosis of Bloodstream Infections. Dtsch Arztebl Int. 2018 Dec 7;115(49):822-832.

KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda – nakladatelství Pavko, 2016. 176 stran. ISBN 978-80-86369-22-8.

KOLÁŘ, Milan. Sepse z pohledu klinické mikrobiologie. Klinická farmakologie a farmacie [online]. 2016, 30(3), 29-32 [cit. 2021-03-30]. ISSN 1212-7973. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2016/03/07.pdf>

LAFaurie, Matthieu, D'ANGLEJAN, E, DONAY, Jean-Luc, GLOTZ, Denis, SARFATI, Emile, MIMOUN, Maurice, LEGRAND, Mathieu, OKSENHENDLER, Eric, BAGOT, Martine, VALADE, Sandrine, BERCOT, Béatrice, MOLINA, Jean-Michel. Utility of anaerobic bottles for the diagnosis of bloodstream infections. BMC Infect Dis. 2020 Feb 14;20(1):142.

LAM, SM, LAU, AC, LAM, RP, YAN, WW. Clinical management of sepsis. Hong Kong Med J. 2017 Jun;23(3):296-305.

LAMBden, Simon, LATERRE, Pierre Francois, LEVY, Mitchell M., FRANCOIS, Bruno. The SOFA score-development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. Crit Care. 2019 Nov 27;23(1):374.

LAMY, Brigitte, SUNDQVIST, Martin, IDELEVICH, Evgeny A; ESCMID Study Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis (ESGBIES). Bloodstream infections – Standard and progress in pathogen diagnostics. Clin Microbiol Infect. 2020 Feb;26(2):142-150.

LEE, Jisoo, LEVY, Mitchell M. Treatment of Patients with Severe Sepsis and Septic Shock: Current Evidence-Based Practices. R I Med J (2013). 2019 Dec 2;102(10):18-21.

LIN, Gu-Lung, MCGINLEY, Joseph P, DRYSDALE, Simon B, POLLARD, Andrew J. Epidemiology and Immune Pathogenesis of Viral Sepsis. Front Immunol. 2018 Sep 27;9:2147.

LUDWIG, Katelyn R, HUMMON, Amanda B. Mass spectrometry for the discovery of biomarkers of sepsis. Mol Biosyst. 2017 Mar 28;13(4):648-664.

MA, Xiao-Yuan, TIAN, Li-Xing, LIANG, Hua-Ping. Early prevention of trauma-related infection/sepsis. Mil Med Res. 2016 Nov 8;3:33. doi: 10.1186/s40779-016-0104-3.

MARIK, Paul E., TAEB, Abdalsamih M. SIRS, qSOFA and new sepsis definition. J Thorac Dis. 2017 Apr;9(4):943-945.

MIERZCHAŁA-PASIERB, Magdalena, LIPIŃSKA-GEDIGA, Małgorzata. Sepsis diagnosis and monitoring – procalcitonin as standard, but what next? *Anaesthesiol Intensive Ther.* 2019;51(4):299-305.

MORI, Yasuyoshi, NOTOMI, Tsugunori. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother.* 2009 Apr;15(2):62-9. doi: 10.1007/s10156-009-0669-9. Epub 2009 Apr 25.

MULTANI, Ashrit, MEER, Abed, SMITH, Darvin S, KHERAJ, Malika N, PLOWEY, Edward D, BLACKBURN, Brian G. Diagnosis of Chagasic Encephalitis by Sequencing of 28S rRNA Gene. *Emerg Infect Dis.* 2019 Jul;25(7):1370-1372.

NG, Lily S, KWANG, Lee Ling, RAO, Suma, TAN, Thean Yen. Anaerobic bacteraemia revisited: species and susceptibilities. *Ann Acad Med Singap.* 2015 Jan;44(1):13-8.

NOLT, Benjamin, TU, Fei, WANG, Xiaohui, HA, Tuanzhu, WINTER, Randi, WILLIAMS, David L, LI, Chuanfu. Lactate and Immunosuppression in Sepsis. *Shock.* 2018 Feb;49(2):120-125.

OBEAGU, Emmanuel Ifeanyi, CHIJIJOKE, UO, EKELIZIE, IS. Malaria Rapid Diagnostic Test (RDTs). *Annals of Clinical Laboratory Research* [online]. 2018, 06(04) [cit. 2021-05-01]. ISSN 2386518. doi: 10.21767/2386-5180.100275. Dostupné z: <https://www.aclr.com.es/clinical-research/malaria-rapid-diagnostic-test-rdts.php?aid=23911>

OPOTA, Onya, JATON, Katia, GREUB, Gilbert. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Apr;21(4):323-31.

OPOTA, Onya, CROXATTO, Antony, PROD'HOM, Guy, GREUB, Gilbert. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Apr;21(4):313-22.

PATEL, Robin. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* 2015 Jan;61(1):100-11. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770. Epub 2014 Oct 2.

PEKER, Nilay, COUTO, Natacha, SINHA, Bhanu, ROSSEN, John W. A. Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Sep;24(9):944-955.

PERNER, Anders, GORDON, Anthony C, DE BACKER, Daniel, DIMOPOULOS, George, RUSSELL, James A, LIPMAN, Jeffrey, JENSEN, Jens-Ulrik, MYBURGH, John, SINGER, Mervyn, BELLOMO,

Rinaldo, WALSH, Timothy. Sepsis: frontiers in diagnosis, resuscitation and antibiotic therapy. *Intensive Care Med.* 2016 Dec;42(12):1958-1969.

PIERRAKOS, Charalampos, VELISSARIS, Dimitrios, BISSDORFF, Max, MARSHALL, John C, VINCENT, Jean-Louis. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Crit Care.* 2020 Jun 5;24(1):287.

RELLO, Jordi, VALENZUELA-SÁNCHEZ, Francisco, RUIZ-RODRIGUEZ, Maria, MOYANO, Silvia. Sepsis: A Review of Advances in Management. *Adv Ther.* 2017 Nov;34(11):2393-2411.

RÓZSA, Lajos, APARI, Péter, SULYOK, Mihály, TAPPE, Dennis, BODÓ, Imre, HARDI, Richárd, MÜLLER, Viktor. The evolutionary logic of sepsis. *Infect Genet Evol.* 2017 Nov;55:135-141.

SCHARFEN, J. Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému. Národní standardní vyšetřovací postup. Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP [online]. 2014 [cit. 2021-04-19]. Dostupné z: <https://www.splm.cz/download/0000016e-78d6-d7e2-a16e-7cf74ae70000>

SCHUBERT, Sören, KOSTRZEWA, Markus. MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. *Curr Issues Mol Biol.* 2017;23:17-20.

STREITOVÁ, Dana a kol. Septické stavy v intenzivní péči: ošetrovatelská péče. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2015. 159 stran, iv stran obrazových příloh. Sestra. ISBN 978-80-247-5215-0

SUN, Yi, XIANG, Daijun, CHEN, Chen, HE, Shang, Qi, Huan, WANG, Chengbin. Infected RBC flag/parameter provided by Mindray BC-6800 haematology analyzer aid the diagnosis of malaria. *Malar J.* 2019 Jul 31;18(1):262.

SVOBODA, Petr et al. Sepse v traumatologii a chirurgii. Vyd. 1. Praha: Triton, 2004. 199 s. ISBN 80-7254-550-7.

TSUCHIDA, Sachio, UMEMURA, Hiroshi, NAKAYAMA, Tomohiro. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. *Molecules.* 2020 Oct 17;25(20):4775.

VAN DER POLL, Tom, OPAL, Steven M. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis.* 2008 Jan;8(1):32-43.

VERDONK, Franck, BLET, Alice, MEBAZAA Alexandre. The new sepsis definition: limitations and contribution to research and diagnosis of sepsis. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2017 Apr;30(2):200-204.

VOTAVA, Miroslav a kol. Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody. Brno: Neptun, ©2010. 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.

VOTAVA, Miroslav a kol. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

WELKER, Martin, VAN BELKUM, Alex, GIRARD, Victoria, CHARRIER, Jean-Philippe, PINCUS, David. An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. *Expert Rev Proteomics.* 2019 Aug;16(8):695-710.

WILSON, Mark L. Critical factors in the recovery of pathogenic microorganisms in blood. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Feb;26(2):174-179.

WONG, Yin Ping, OTHMAN, Sammy, LAU, Yu-Lung, RADU, Son, CHEE, Hui Yee. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 2018 Mar;124(3):626-643. doi: 10.1111/jam.13647. Epub 2018 Feb 12.

ZAZULA, Roman, SCHINDLER, Ivo, SPÁLENÝ, Antonín, VAŠÁKOVÁ, Martina, DUTKA, Juraj. Současný pohled na mykotické plicní infekce. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2005, 7(7), 249-253 [cit. 2021-03-31]. ISSN 18035256. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2005/07/07.pdf>

ZIMA, Tomáš. Laboratorní diagnostika. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, ©2013. xlii, 1146 s. ISBN 978-80-7492-062-2.

14 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: SOFA skóre (<i>zdroj: Holub, 2018 – převzato, přeloženo a upraveno</i>).....	16
Tabulka 2: Původci bakteriálních sepsí – diagnostika (<i>zdroj: Votava a kol., 2010 – přepracováno z textu do tabulky</i>)	26
Tabulka 3: Původci mykotických sepsí – diagnostika (<i>zdroj: Votava a kol., 2010 – přepracováno z textu do tabulky</i>)	29