

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Komparace metodických přístupů, metody dle Maki a sonikační metody, v rámci hodnocení mikrobiálního osídlení centrálních venózních katetrů

Karolína Bugnová

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

Poděkování

Tímto chci poděkovat RNDr. Kláře Konečné, PhD. za vstřícnost, cenné rady a odborné vedení při tvorbě této bakalářské práce. Dále děkuji primářce mikrobiologické laboratoře MUDr. Erice Czyžové za ochotu a odborné rady v experimentální oblasti této práce. A v neposlední řadě děkuji také své rodině za toleranci a podporu po celou dobu studia.

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita pro získání jiného nebo stejného kvalifikačního titulu.“

V Hradci Králové 2022

Karolína Bugnová

OBSAH

1.	Abstrakt	6
2.	Abstract	8
3.	Úvod.....	10
4.	Zadání – cíl práce	11
5.	Teoretická část.....	12
5.1	Mikrobiální biofilm	12
5.1.1	Struktura biofilmu	13
5.1.2	Tvorba biofilmu	15
5.2	Centrální žilní katetr	17
5.2.1	Infekce asociované se zavedením centrálního venózního katetru	17
5.2.2	Původ infekcí krevního řečiště sdružených se zavedením centrálního venózního katetru	18
5.2.3	Nejčastější původci infekcí krevního řečiště sdružených se zavedením centrálního venózního katetru.....	19
•	Koaguláza-negativní stafylokoky	20
•	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20
•	<i>Staphylococcus aureus</i>	22
•	<i>Candida albicans</i>	24
6.	Experimentální část	26
6.1	Metody zaměřené na detekci mikroorganismů formujících biofilm na extrahovaných centrálních venózních katetrech	26
6.1.1	Metoda dle Maki	27
6.1.2	Metoda sonikace	28
6.1.3	Identifikace mikroorganismů pomocí instrumentace MALDI-TOF	31
6.2	Metodika výzkumu	31

6.2.1	Použitý materiál	32
6.2.2	Postup zpracování centrálních venózních katetrů	33
7.	Výsledky a porovnání nálezů získaných Makiho metodou a sonikační metodou ...	38
8.	Diskuse.....	44
9.	Závěr	47
10.	Použité zkratky	48
11.	Seznam tabulek	49
12.	Seznam obrázků.....	50
13.	Seznam grafů	51
14.	Použitá literatura	52

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor: Karolína Bugnová

Školitel: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Název bakalářské práce: Komparace metodických přístupů, metody dle Maki a sonikační metody, v rámci hodnocení mikrobiálního osídlení centrálních venózních katetrů

Cíl práce: Jedním z cílů této bakalářské práce je poskytnout základní informace o tvorbě mikrobiálních biofilmů a mikroorganismech vytvářejících tato společenství, která často stojí za infekcemi sdruženými se zavedením centrálních venózních katetrů. V rámci této práce jsou rovněž uvedeny metody používané k detekci a identifikaci mikrobů tvořících biofilm. Hlavním cílem experimentální části této práce je provést kvalitativní srovnání výsledků získaných metodou dle Maki a sonikační metodou, které slouží pro diagnostiku biofilm formujících mikroorganismů osídlujících centrální venózní katetry. Hlavní snahou je zjistit, zda sonikační metoda přináší větší přínos pro diagnostiku infekcí asociovaných se zavedením centrálních venózních katetrů než Makiho metoda.

Metody: V této práci bylo zanalyzováno celkem 11 vzorků centrálních venózních katetrů získaných od pacientů z lůžkových oddělení Nemocnice Šumperk a.s. Vzorky byly zpracovány standardně používanou Makiho metodou a zároveň sonikací v ultrazvukové lázni, která se běžně pro diagnostiku katetrů nevyužívá. Sonikát byl následně vyočkován na krevní agar, MacConkey agar a napipetován do živného bujónu. Tyto živné půdy byly kultivovány po dobu 24 hodin, při teplotě 37°C. Identifikace mikroorganismů byla provedena pomocí MALDI-TOF MS.

Výsledky: Ze všech analyzovaných vzorků bylo 55 % vyhodnoceno jako negativní a 45 % jako pozitivní. V 91 % případů byla zaznamenána shoda v kvalitativních nálezech získaných Makiho metodou a sonikací. U jednoho vzorku (9 %) došlo k diskrepanci nálezu, která byla pravděpodobně způsobena delší časovou prodlevou mezi použitými

metodami. Nejčastějšími mikroorganismy, které kolonizovaly povrch katetrů, byly koaguláza-negativní stafylokoky. Dále byly identifikovány bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a *Lactobacillus paracasei*. V jednom případě byl detekován polydruhový biofilm tvořený bakteriemi *Staphylococcus hominis* a *Staphylococcus epidermidis*. Všechny pozitivní nálezy byly pouze bakteriálního původu.

Závěry: Získané výsledky potvrdily předpoklad, že sonikační metodu lze využít pro mikrobiální vyšetření centrálních venózních katetrů místo Makiho metody. Ovšem vyšší citlivost sonikační metody se tímto výzkumem prokázat nepodařilo.

Klíčová slova: Mikrobiální biofilm, centrální venózní katetr, metoda dle Maki, sonikační metoda.

2. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Subject of study: Laboratory diagnostics in healthcare

Student: Karolína Bugnová

Supervisor: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Title: Comparison of methodical approaches, Maki and sonication method, within the evaluation of microbial settlement of central venous catheter

Background: The aim of this thesis is to provide basic information about biofilm formation and their agents, infections associated with the introduction of central venous catheters and methods used to detect and identify biofilm forming microbes. The main goal of the experiment is a qualitative comparison of the results obtained by the Maki method and the sonication method, which are used for the diagnosis of biofilm forming microorganisms inhabiting central venous catheters. A partial goal is to determine whether the sonication method is greater benefit for the diagnosis of infections associated with the introduction of central venous catheters than the Maki method.

Methods: In this work, a total of 11 samples of central venous catheters obtained from patients from inpatient departments of the Nemocnice Šumperk a.s. were analyzed. The samples were processed by the standard Maki method and at the same time by sonication in an ultrasonic bath, which is not commonly used for the diagnosis of catheters. The sonicate was then inoculated onto blood agar, MacConkey agar, and pipetted into nutrient broth. These media were cultured at 37°C for 24 hours, and the microorganisms were identified on a MALDI-TOF analyzer.

Results: Of all samples analyzed, 55 % were evaluated as negative and 45 % as positive. In 91 % of cases, conformity was noted in the qualitative findings obtained by the Maki method and sonication. One sample (9 %) had a discrepancy in the finding, which was probably due to a longer time lag between the methods used. The most common

microorganisms that colonized the catheter surface were coagulase-negative staphylococci. *Pseudomonas aeruginosa* and *Lactobacillus paracasei* were also identified. In one case, a polyspecific biofilm formed by *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus epidermidis* was detected. All positive findings were of bacterial origin only.

Conclusions: The obtained results confirmed the assumption that the sonication method can be used for microbial examination of central venous catheters instead of the Maki method. However, this research did not prove a higher sensitivity of the sonication method.

Key words: Microbial biofilm, central venous catheter, Maki method, sonication method.

3. ÚVOD

Použití centrálních venózních katetrů je v posledních letech stále častější, a to i z důvodu zvyšujícího se počtu pacientů vyžadujících dlouhodobou hospitalizaci ve zdravotnických zařízeních. I přes veškerou snahu moderní medicíny co nejvíce eliminovat rizika spojená se vznikem infekcí krevního řečiště asociovaných se zavedením centrálních venózních katetrů, jsou tyto infekce stále příčinou řady komplikací u mnoha pacientů. Na druhou stranu jsou cévní katetry nenahraditelné. Umožňují rychlý přístup do krevního řečiště pacienta, což je důležité zejména v situacích, kdy je jeho zdravotní stav natolik vážný, že je potřeba okamžitá aplikace léčiv.

Výskyt infekcí krevního řečiště úzce souvisí nejen s přítomností biofilm formujících mikrobů, ale i s typem použitého katetru, respektive s materiálem, ze kterého je vyroben a samozřejmě také s dobou jeho setrvání v těle pacienta. Mikrobiologická diagnostika původce infekce je klíčová pro stanovení konečné diagnózy a současně pro volbu vhodné léčebné terapie.

Infekce cévního řečiště jsou spojeny s vysokou mortalitou a patří mezi nejzávažnější choroby asociované s tvorbou biofilmu. Kromě toho, že tyto infekce zatěžují pacienta a komplikují jeho zdravotní stav, také zvyšují náklady na jeho léčbu.

4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce je uvést stěžejní informace o vzniku a vývoji biofilmu, dále o problematice infekcí asociovaných se zavedením centrálních venózních katetrů a popsat nejčastější původce těchto infekcí, jimiž jsou biofilm formující mikroorganismy.

Cílem experimentální části je vysvětlit principy sonikační a Makiho metody, a také princip identifikace mikroorganismů přístrojem MALDI-TOF MS určeného pro identifikaci mikrobů. Dále detailně popsat postupy experimentální práce a zhodnotit získaná data. Hlavním záměrem této práce je především provést kvalitativní porovnání výsledků kultivace centrálních venózních katetrů získaných oběma metodami, tedy posoudit, zda byl sonikační metodou detekován stejný mikroorganismus jako v případě Makiho metody, a zda sonikace vykazuje vyšší citlivost než nejvíce používaná Makiho metoda.

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Mikrobiální biofilm

Za mikrobiální biofilm je považováno organizované společenství mikroorganismů, které je přichyceno na nejrůznějších typech povrchů, které jsou v bezprostřední blízkosti tekutiny. Růst bakterií ve formě biofilmu poskytuje těmto mikroorganismům řadu benefitů. Na rozdíl od planktonní populace buněk, které jsou suspendované v tekutém médiu, jsou bakterie v biofilmu chráněné před nepříznivými vlivy prostředí (toxické látky, UV záření, stříhové síly proudící kapaliny), tato bariéra jim také poskytuje určitou mechanickou odolnost a stabilitu. Zároveň toto uskupení umožňuje mikrobům získávat potřebné živiny, odvádět metabolity a chrání je před účinkem imunitního systému. Díky struktuře biofilmu klesá účinnost antibiotik, což je jedním z důvodů vzrůstající rezistence bakterií na tuto léčebnou terapii. [1]

Biofilmy jsou prakticky všudypřítomné, protože jejich výskyt je úzce spojen s přítomností mikroorganismů. Lze je nalézt jak v přírodním prostředí, tak i v některých průmyslových odvětvích, jako např. v čistírnách odpadních vod, v potravinářství, ve výměnících tepla, potrubních systémech a samozřejmě také v medicíně. Faktem je, že přítomnost biofilmů nemusí být vždy nežádoucí, nezbytná je např. v biotechnologii, v čistírnách odpadních vod či v potravinářství, konkrétně při výrobě piva, vína a sýrů. Avšak ve zdravotnictví je jejich výskyt spojen s řadou komplikací, především pak u pacientů s kovovými či umělohmotnými implantáty. [1]

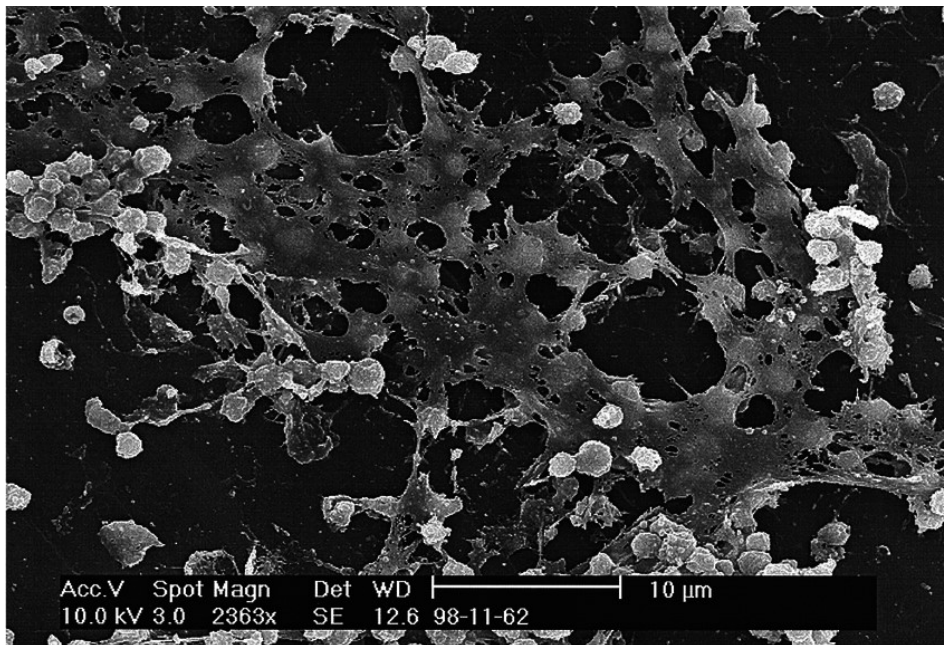
Úroveň současné medicíny umožňuje široké využití umělohmotných náhrad, což je příčinou rostoucího významu biofilmu, který je v posledních letech předmětem intenzivního výzkumu. Fyzikálně-chemické vlastnosti implantátů jsou ideálním povrchem pro snadnější a pevnější přilnutí mikrobů, což je zcela zásadní prvotní krok pro tvorbu biofilmů. Právě biofilmy jsou zodpovědné za většinu infekcí souvisejících se zavedením cizorodého materiálu do těla pacienta. Podle Národního institutu zdraví je 80 % všech chronických infekcí a 65 % mikrobiálních infekcí zapříčiněno přítomností biofilmu. [1, 2]

Biofilmy mikrobiálního původu mohou být tvořeny různými druhy bakterií a kvasinek. Existují monodruhové biofilmy, které jsou reprezentovány pouze jedním

druhem mikroorganismů a polydruhové, jenž sestávají z několika druhů, kdy zpravidla nejprve vzniká mladý biofilm tvořený primárním kolonizátorem, na který nasedají buňky jiného mikroba. [1]

5.1.1 Struktura biofilmu

Mikrobiální společenství je uloženo v mezibuněčné hmotě a pevně přichyceno k syntetickému (Obrázek č.1) nebo biotickému povrchu. Mezibuněčná matrix má slizovitý charakter a spolu s mikrobiálními buňkami vytváří složité struktury, ve kterých se nachází síť kanálků, jimiž proudí živiny s vodou k jednotlivým bakteriím a metabolity jsou odváděny ven z biofilmu. [1]



Obrázek č.1: Snímek biofilmu tvořený bakterií *Staphylococcus aureus* na intraluminálním povrchu katetru zachycený elektronovou mikroskopií

Převzato z Donlan R. M. et al., 2001 [3]

Přesné složení matrice biofilmu se mezi různými mikroorganismy velmi liší a závisí na okolních růstových podmínkách. Obecně matrice sestává z exopolysacharidů (1-2 %), proteinů a nukleových kyselin, souhrnně nazývaná extracelulární polymerní matrice (EPS). Mezi proteinové složky patří adhesiny buněčného povrchu, proteinové podjednotky bičků a pili, sekretované extracelulární proteiny a proteiny transportované do extracelulárního prostředí skrze vezikuly vnější membrány. [4, 5]

Proteiny buněčného povrchu, pili a bičíky se účastní počátečního připojení mikrobiálních buněk k povrchům a u některých mikroorganismů se také podílejí na migraci podél těchto povrchů, čímž usnadňují jejich kolonizaci. Matricové proteiny přispívají ke struktuře a stabilitě biofilmu. [4]

Role těchto proteinů byla často objasněna na základě studií se zařazením mutantních kmenů, ve kterých byly knock-outovány geny, kódující sledované proteiny. Tyto studie ukázaly, že nepřítomnost určitých matricových proteinů má za následek sníženou tvorbu a stabilitu biofilmu a změněnou architekturu biofilmu. V jedné studii bylo například prokázáno, že mutantní kmen *P. aeruginosa* s deficitem ve tvorbě proteinu LecB má, ve srovnání s původním (wild-type) kmenem, narušenou tvorbu biofilmu, což naznačuje důležitou roli proteinu LecB v tomto procesu. [4, 6]

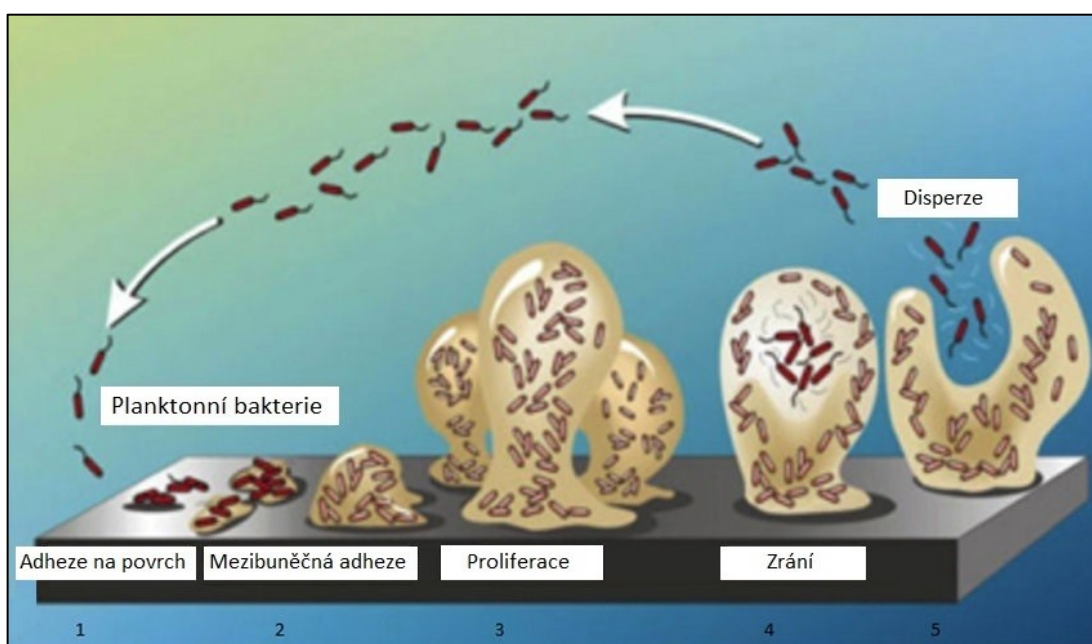
Polysacharidová složka matrice může buňkám v biofilmu poskytnout mnoho různých výhod, včetně adheze, komplexní struktury a ochrany před antibiotiky a imunitním systémem hostitele. Agregativní polysacharidy působí jako molekulární lepidlo, které umožňuje bakteriálním buňkám přilnout nejen k sobě navzájem, ale i k samotným povrchům. Adheze usnadňuje kolonizaci biotických i uměle vytvořených povrchů tím, že umožňuje bakteriím odolávat fyzickému stresu způsobenému pohybem tekutiny, který by mohl oddělit buňky od zdroje živin. [5]

Přestože exopolysacharidy jsou pouze minoritní složkou EPS, jejich role při formování biofilmu je zcela zásadní. Díky jejich struktuře dojde k vytvoření pevné kostry, do které jsou zasazeny mikrobiální buňky a jejich bioaktivní látky. [1]

Kromě výše uvedených komponent se v EPS nacházejí především voda (97 %) a další anorganické (ionty vázané a volné) i organické látky, zejména peptidoglykany, lipidy, fosfolipidy a jiné buněčné substance. [1]

5.1.2 Tvorba biofilmu

Biofilm se může tvořit na různých typech povrchů, tento složitý proces probíhá v několika navazujících krocích (Obrázek č.2). V odborné literatuře se však můžeme setkat s různým pohledem autorů na vznik a vývoj biofilmů. Ale v zásadě hlavní kroky tohoto děje zůstávají stejné. Na počátku dochází k adhezi buněk k povrchu, po které následuje seskupení buněk do mikrokoloníí a nakonec diferenciacie biofilmu do zralé struktury. Po úplném vyvinutí biofilmu dochází k jeho rozrušování a disperzi zprostředkované mechanickými, či aktivními procesy. [7]



Obrázek č.2: Základní fáze vývoje biofilmu

Převzato z Karaguler T. et al., 2017 [8] a upraveno

Ve zdravotnictví se lékaři běžně setkávají s problematikou tvorby biofilmu především na protetických pomůckách a implantátech. Přirozeným procesem při vložení cizího tělesa do lidského organismu je reakce imunitního systému, která vyvolá formování primární organické vrstvy na jeho povrchu. Tato vrstva je tvořena hlavně bílkovinami, konkrétně fibrinem a fibronektinem, na které se mohou vázat adheziny produkované na povrchu buněčné stěny bakterií. Tento proces usnadňuje přichycení bakterií k cizorodému materiálu. [9]

Dalším předpokladem tvorby biofilmu je, aby se bakterie dostaly dostatečně blízko k danému povrchu. Jak se bakterie přibližují k povrchu, vstupuje do hry několik sil, jak přitažlivých, tak odpuzivých. Ve vzdálenosti asi 10–20 nm od povrchu jsou negativní náboje na povrchu bakterií odpuzovány negativními náboji na většině povrchů. Toto odpuzování je však překonáno prostřednictvím přitažlivých van der Waalsových sil mezi bakteriálními buňkami a povrchem. Stejně tak tomu napomáhají fimbrie, které zajišťují mechanické připojení k povrchu a bičíky usnadňující pohyb a přiblížení. [10]

Po úspěšné adhezi na povrch materiálu dochází k růstu a proliferaci bakteriálních buněk, které začínají produkovat EPS a další extracelulární látky. Zároveň se jednotlivé buňky vzájemně spojují mezi sebou prostřednictvím intercelulárních adhezínů. Tímto způsobem vzniká stabilnější mnohvrstevná komplexní struktura. Metabolická aktivita bakterií je nejvyšší právě ve fázi proliferace a vyrábání. Na rozdíl od předchozích kroků, kdy vznikl pouze jednoduchý jednovrstevný biofilm, je tato část procesu již nevratná. [1]

Plně vyžralý biofilm získává „věžovitou“ trojrozměrnou strukturu. Tato struktura se skládá z malých kanálků, které transportují živiny, vodu a metabolity, a z malých dutinek poskytujících úkryt pro planktonní bakterie. Studie také ukazují, že organizace a architektura biofilmů se u různých bakterií velmi liší, což je dáno rozdílnou genetickou výbavou jednotlivých kmenů. Tyto geny kódují proteiny, které jsou hlavní součástí EPS, to znamená, že různé druhy bakterií mají odlišné složení matrice a tím pádem i rozdílné vlastnosti biofilmu. Nakonec tyto trojrozměrné struktury buď erodují (malé části), nebo jsou odloupnuty (velké části) a oddělují se, čímž se vyprázdní dutiny obsahující bakterie, které nejsou přichycené k povrchu. Tímto způsobem dochází k diseminaci mikrobů do dalších částí těla, kde mohou vytvářet nová ložiska infekce (tvorba nového biofilmu). [7]

Mechanismem, který hraje zásadní roli při tvorbě biofilmu je tzv. *quorum sensing* (QS). Jedná se o regulační systém uplatňující se na úrovni mezibuněčné komunikace, prostřednictvím signálních molekul tzv. autoinduktorů vyvolává expresi genů v závislosti na hustotě populace a tím ovlivňuje množství bakterií v biofilmu. Tento fenomén mikrobiální interakce úzce souvisí s faktory virulence a antibiotické rezistence bakterií, intenzita produkce těchto faktorů je koordinována mechanismem QS podle zralosti

biofilmu. V posledních fázích vývoje biofilmu tak patogeny vykazují zvýšenou míru virulence. [1, 9]

5.2 Centrální žilní katetr

Centrální venózní katetry (CVK) jsou součástí každodenní lékařské praxe, především při léčbě pacientů na lůžkových odděleních nemocnic (např. jednotkách intenzivní péče, interním či chirurgickém oddělení). Pacienti, u kterých je zavedení CVK indikováno, jsou zpravidla v život ohrožujícím stavu a je velmi důležité aplikovat katetr asepticky. CVK umožňuje rychlý přístup do krevního řečiště pacienta, což je výhodné zejména při léčbě klinicky závažných stavů. S pomocí CVK lze zavést parenterální výživu, aplikovat antibiotika a krevní deriváty nebo měřit centrální žilní tlak při léčbě chemoterapií. [11]

Aplikace katetru do těla pacienta může být spojena s řadou úskalí a zdravotních komplikací. Obtíže nastávají při samotném zavádění CVK, kdy může dojít ke kontaminaci katetru mikroorganismy přítomnými na kůži v místě vstupu a tím i k rozšíření infekce do dalších tkání. Často dochází i ke komplikacím spojeným s dlouhodobě zavedeným katetrem a pokud není katetr včas z těla odstraněn, může se u pacienta rozvinout sepse. Se zvýšeným rizikem výskytu infekce je spojeno i opakované zavádění CVK stejnému pacientovi. [11]

5.2.1 Infekce asociované se zavedením centrálního venózního katetru

Nejčastější komplikace použití CVK je spojena se zvýšenou morbiditou, mortalitou a délkou hospitalizace. Mezi rizikové faktory rozvoje kolonizace katetru a infekce krevního řečiště patří faktory související se zdravotním stavem pacienta (např. zvýšené riziko spojené s malignitou, neutropenií a šokem) a faktory související s léčbou (zvýšené riziko spojené s celkovou parenterální výživou, přijetím na jednotku intenzivní péče z jakéhokoli důvodu a endotracheální intubací). Dalšími rizikovými faktory jsou prodloužená doba setrvání katetru v organismu, nedodržení přísných aseptických podmínek při zavádění CVK a častá manipulace s katetrem. Zásadním faktorem je také následná péče o katetr po jeho zavedení. [12]

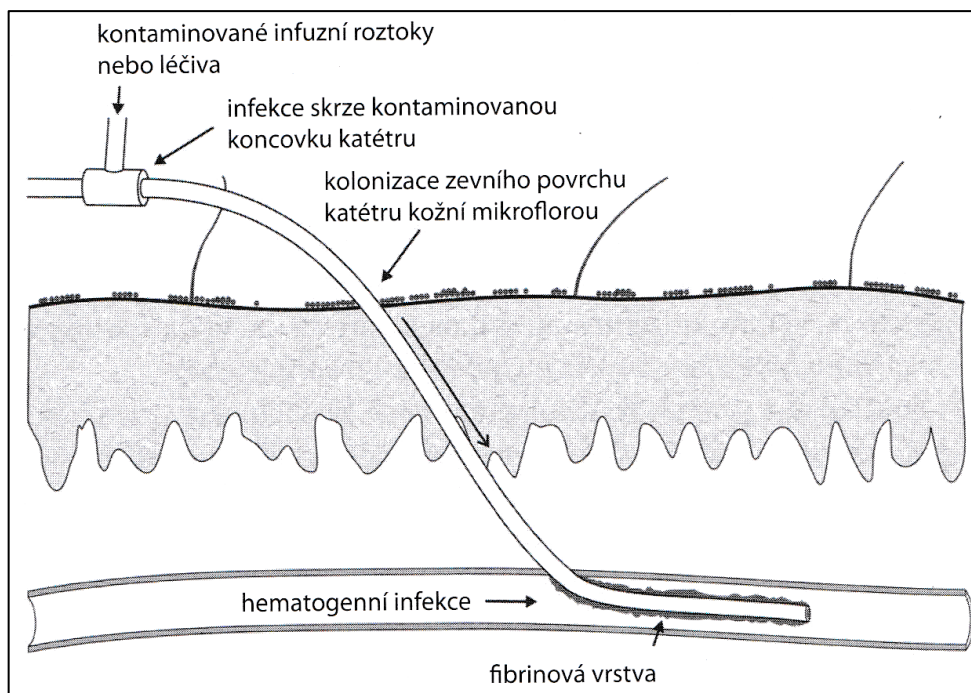
5.2.2 Původ infekcí krevního řečiště sdružených se zavedením centrálního venózního katetru

U zavedeného katetru může dojít k jeho tzv. extraluminální kolonizaci mikroorganismy, kdy dochází k osídlení vnějšího povrchu katetru, či intraluminální kolonizaci, tedy osídlení jeho vnitřní části (Obrázek č.3). Extraluminální kolonizace se typicky objevuje u krátkodobě zavedených katetrů (<10 dní) a nejčastěji je způsobená kožním mikrobiomem vyskytujícím se v místě inserce zavedeného katetru. Mikroorganismy pak mohou dále migrovat po jeho transkutánním segmentu a tímto způsobem může dojít k zavlečení infekce do okolních tkání, hlubších vrstev kůže a podkožních tkání. Pokud ovšem dojde ke kolonizaci intravaskulární části katetru, rozvíjí se bakteriémie nebo fungemie. Mezi obvyklé původce těchto infekcí patří koaguláza-negativní stafylokoky (CoNS, coagulase-negative staphylococci) či bakterie *Staphylococcus aureus*. [13]

Dalším faktorem zvyšujícím riziko extraluminální kolonizace a vznik následné infekce je nevhodná manipulace s katetrem před nebo v průběhu jeho zavádění. Nejčastějším zdrojem jsou kontaminované ruce personálu, a proto je důležité dodržovat přísně aseptické postupy, které toto riziko eliminují. [14]

Intraluminální kolonizace je často způsobena kontaminací koncovky katetru, přičemž i zde je nejčastější příčinou nedodržení aseptických podmínek při jeho zavádění. Kromě toho se zvyšujícím se počtem manipulací s katetrem je riziko infekce větší. Kolonizace lumen katetru kontaminovanými infuzními přípravky nebývá obvyklá, a to v důsledku preventivních opatření, která byla zavedena v souvislosti s přípravou těchto roztoků. [15, 16]

Intraluminální kolonizace může být také způsobena hematogenní infekcí. Primárním zdrojem infekce je v tomto případě buď přechodná bakteriémie či fungemie anebo přítomnost jiného ložiska v krevním oběhu. K přechodné bakteriemii dochází při uvolňování mikrobů do krevního řečiště z ložisek, které se nacházejí mimo cévní systém. [16]



Obrázek č.3: Možné zdroje infekcí sdružených se zavedením centrálního venózního katétru

Převzato z Rulík a spol., 2011 [1]

5.2.3 Nejčastější původci infekcí krevního řečiště sdružených se zavedením centrálního venózního katétru

Sepse se vyvíjí z bakterií přítomných v krvi, když imunitní systém spustí obrannou imunitní odpověď. Dlouho se věřilo, že je to způsobeno především gramnegativními bakteriemi. Během druhé poloviny 20. století se grampozitivní bakterie, zejména *Staphylococcus aureus*, staly hlavními příčinami sepse a úmrtí s tím souvisejících. Koaguláza-negativní stafylokoky s hlavním druhem *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) jsou také uváděny jako časté příčiny sepse, zejména u novorozenců. [17]

Nicméně skutečnost, že koaguláza-negativní stafylokoky jsou všudypřítomnými komenzály na lidské kůži, ztěžuje mikrobiologickou diagnostiku skutečné infekce krve CoNS, protože přítomnost těchto mikrobů ve vzorcích krve je často způsobena spíše kontaminací než skutečnou infekcí. Přesné procento toho, kolik pozitivních hemokultur je způsobeno kontaminací, se mezi mnoha studiemi, které se pokoušely toto číslo odhadnout, značně liší. Nicméně panuje shoda, že *Staphylococcus epidermidis* patří mezi nejčastější bakteriální zdroje, které jsou základem bakteriémie a sepse. [17]

Uvádí se, že třetinu až polovinu těchto infekcí způsobují výše zmíněné grampozitivní CoNS v čele s bakterií *Staphylococcus epidermidis*, čtvrtinu gramnegativní bakterie, nejčastěji enterobakterie (např. *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) a pseudomonády. Kvasinky, především rodu *Candida*, jsou sice zastoupeny méně často, avšak jejich výskyt bývá spojován s vysokou mortalitou pacientů. [18, 19, 20]

- **Koaguláza-negativní stafylokoky**

Koaguláza-negativní stafylokoky jsou heterogenní skupinou stafylokokových druhů klasifikovaných klinicky podle absence enzymu plazmakoagulázy srážejícího krev. To je odlišuje od ostatních příslušníků tohoto rodu, v čele s bakterií *Staphylococcus aureus* a několika dalšími, klinicky méně významnými koaguláza-positivními druhy. Dnes jsou CoNS nejčastěji izolované bakterie v klinických materiálech, ukázaly se jako nejvýznamnější nemocniční patogeny a jsou řazeny mezi hlavní původce nozokomiálních nákaz. [21]

CoNS jsou nedílnou součástí běžného mikrobiomu lidské kůže a sliznic, také přednostně kolonizují vlhké oblasti těla. I když jsou obvykle neškodnými nebo dokonce prospěšnými kolonizátory, jakmile je narušena epiteliální bariéra hostitele, můžou CoNS způsobit závažné infekce. Ve skutečnosti jsou infekce vyvolané CoNS odpovědné za většinu bakteriální sepsy a infekcí souvisejících s přítomností cizího tělesa, přičemž *Staphylococcus epidermidis* je v tomto ohledu nejvýznamnějším druhem. [22, 23]

- ***Staphylococcus epidermidis***

Staphylococcus epidermidis je grampozitivní kok, který tvoří shluky a jak již bylo zmíněno, je jednou z hlavních příčin infekce krevního řečiště související se zavedeným katetrem. K infekci většinou dochází, když bakterie migrují z kůže pacienta na povrch katetru a dále do krevního řečiště. U infikovaných pacientů se mohou projevit lokálními příznaky, jako je zánět, erytém nebo hnisání v okolí zavedení katetru. Mohou se také projevovat systémovými příznaky, jako je horečka, hypotenze a dalšími příznaky typické pro sepsi. [23]

Toto bakteriální agens je obvykle symbiontem, který je ve svém přirozeném prostředí neškodný. Je to však i oportunní patogen, který velmi často osídluje také zdravotnické a protetické pomůcky, na kterých vytváří biofilmy. Ty se stávají potenciálně infekčním rezervoárem *S. epidermidis* a pokud dojde k jeho uvolnění, což je zcela přirozený proces při vývoji biofilmu, může se rozšířit do celého organismu a způsobit závažné zdravotní komplikace. [24]

Při léčbě infekcí způsobených *S. epidermidis* se předpokládá jeho rezistence na meticilin, což bylo v řadě výzkumných studií potvrzeno, a proto je lékem první volby vankomycin. V případě, že je zjištěna citlivost na meticilin, lze jej použít pro terapii, stejně jako jiná beta-laktamová antibiotika (např. oxacilin, nafcilin). Léčba se ovšem odvíjí od závažnosti infekce, zdravotního stavu pacienta a ve většině případů je nezbytné vyjmutí implantátu a tím odstranění zdroje nákazy. [25]

Předpokládá se, že mezi hlavní faktory virulence *S. epidermidis* patří peptidoglykany, povrchové proteiny, kapsulární polysacharid-adheziny a jiné adheziny, dále také polysacharidový intercelulární antigen a jiné další substance potřebné k tvorbě základní matrix biofilmu. Pokud je do těla zaveden jakýkoli umělohmotný nebo kovový implantát (mimo jiné např. totální endoprotéza, umělá srdeční chlopeň, kardiostimulátor) dochází velmi rychle k tvorbě bílkovinného povlaku, který usnadňuje adhezi této bakterie i následnou tvorbu biofilmu. Toto uspořádání zároveň potlačuje fagocytární schopnost neutrofilů a monocytů. [26]

Kromě již zmíněné infekce cévního řečiště *S. epidermidis* způsobuje také infekce močových cest, především u starších pacientů s permanentním katetrem. Za spoluúčasti jiných bakterií může být příčinou infekce operačních ran a vzniku mozkových abscesů. Může být i původcem bakteriémie, hlavně u osob s nižším počtem neutrofilů a u nedonošených novorozenců. [26]



Obrázek č.4: Kolonie *Staphylococcus epidermidis* na krevním agaru
Kultivace 24 hodin, aerobní atmosféra, 37°C

Převzato z

<https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria/photos/bacteria%20under%20microscope/staphylococcus%20epidermidis%20microscopy.html#> [27]

- ***Staphylococcus aureus***

Grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) je asymptomatickým kolonizátorem lidských nosních dutin, přibližně 30 % jedinců je trvale kolonizováno. Je také hlavní příčinou infekcí kůže a měkkých tkání, zejména u již kolonizovaných jedinců. Zatímco lokální kožní infekce většinou spontánně odezní, někdy se pro tento patogen stávají vstupní branou do hlubších tkání a krevního řečiště – kožní infekce jsou ve skutečnosti nejčastěji identifikovaným zdrojem bakteriémie způsobené *S. aureus*. [28]

Jakmile tato bakterie vstoupí do krevního řečiště, může se dále šířit do mnoha různých míst, což způsobuje závažné projevy onemocnění, jako je sepse, infekční endokarditida a hluboko uložené abscesy prakticky v každé orgánové tkáni. Pro léčbu stafylokokových infekcí se běžně používají beta-laktamová antibiotika jako meticilin

a oxacilin. *S. aureus* má ovšem schopnost vývoje rezistence proti řadě antibiotik, nejznámější variantou je rezistence vůči meticilinu a tím i k oxacilinu. Pokud se vyvine, hovoříme o tzv. MRSA (meticilin-rezistentní *S. aureus*). Tato rezistence komplikuje léčbu, kdy je nutno použít záložní antibiotika (např. vankomycin, daptomycin, klindamycin a linezolid), která ovšem nemusí mít tak spolehlivý účinek jako oxacilin, který je lékem první volby proti stafylokokovým infekcím. Izoláty MRSA si však mohou vyvinout rezistenci i proti terapiím poslední instance a může dojít k selhání terapie. [26, 29]

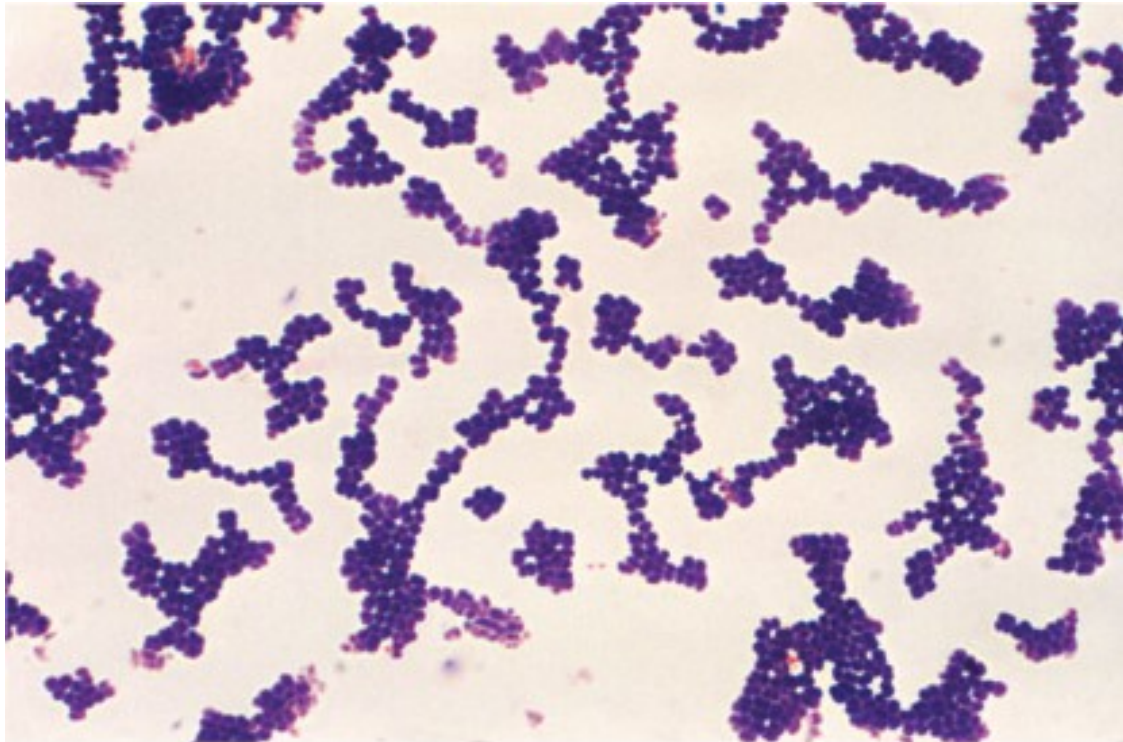
Tato bakterie disponuje řadou různorodých faktorů virulence, tyto faktory lze rozdělit na povrchové a extracelulární. Mezi povrchové faktory patří především vázaná koaguláza (clumping factor), kdy tento enzym způsobuje shlukování stafylokokových buněk díky jeho schopnosti měnit fibrinogen na nerozpustný fibrin. Z dalších povrchových faktorů lze jmenovat třeba protein A, peptidoglykan nebo polysacharidy. [26]

Extracelulární faktory zahrnují především enzymy a toxiny. Volná koaguláza (plazmakoaguláza) má podobný účinek jako již dříve zmíněná vázaná koaguláza. Vzniklý fibrin pak ohraničuje ložisko infekce, což je důvodem vzniku abscesů. Fibrinolysin má účinek opačný, rozpouští fibrin a napomáhá tak stafylokokům šířit se do ostatních tkání. Kataláza zase rozkládá peroxid vodíku, který je pro stafylokoky jedovatý, na vodu a kyslík. Dalším důležitým enzymem je penicilináza, která svým působením inaktivuje beta-laktamová antibiotika, a právě to je jeden z mnoha důvodů rezistence stafylokoků na antibiotika. [26]

Z toxinů jsou to hlavně cytolyziny, enterotoxiny, exfoliatiny a toxin syndromu toxického šoku. Do cytolyzinů spadají hemolyziny (alfa, beta, gama, delta) a leukocidin. Enterotoxiny jsou odolné vůči kyselému pH žaludeční sliznice a mohou tak vyvolávat těžké průjmy a zvracení. Účinkem exfoliatinů se odlupují svrchní vrstvy pokožky a rozvíjí se tzv. syndrom opažené kůže. [26]

I když se u většiny jedinců kolonizovaných *S. aureus* invazivní infekce nevyvine, celkový počet infikovaných jedinců řadí *S. aureus* mezi přední patogeny způsobující infekce krevního řečiště. Tyto infekce se vyznačují vysokou úmrtností i přes správnou léčbu (od 20 % do 50 % v závislosti na závažnosti infekce), častými recidivami (5-10 %)

a trvalými následky u více než jedné třetiny přeživších. Výskyt infekcí krevního řečiště *Staphylococcus aureus* v posledních letech ve vyspělých zemích stoupá. Závažné infekce vyvolané *S. aureus* jsou také přehlíženým, ale významným problémem v rozvojových zemích. [28]



Obrázek č.5: Mikroskopický preparát *Staphylococcus aureus* obarvený dle Grama
Celkové zvětšení: 1000x

Převzato z https://ebrary.net/67955/health/staphylococcus_aureus [30]

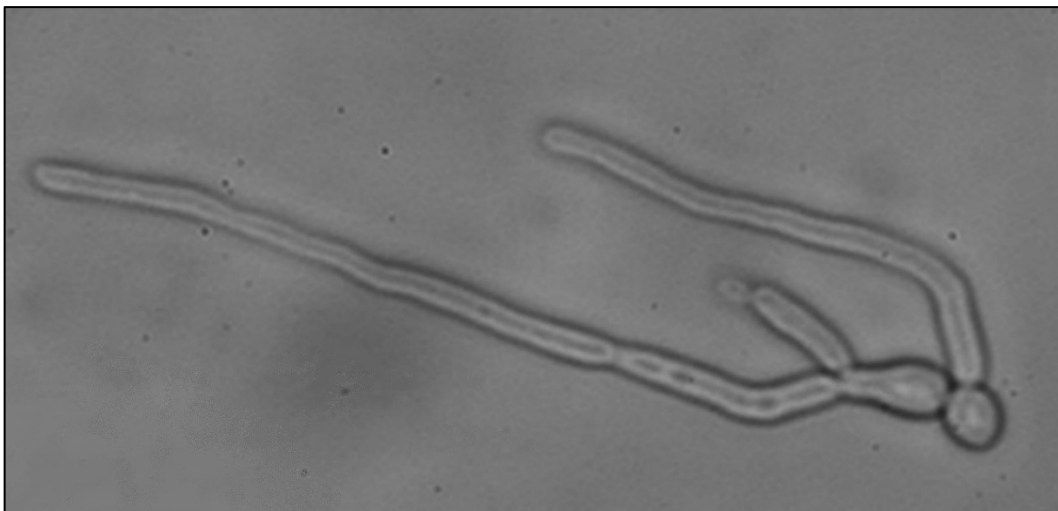
- ***Candida albicans***

Candida albicans (*C. albicans*) spadá do říše hub a je běžným kolonizátorem slizničních povrchů člověka a vyskytuje se u 75 % populace. Zatímco kolonizace touto kvasinkou obvykle zůstává u zdravých jedinců benigní, imunosuprimovaní pacienti jsou vystaveni zvýšenému riziku rozvoje různých infekcí. Na rozdíl od povrchových infekcí jsou systémová kandidóza a kandidové infekce krevního řečiště život ohrožující stavy s úmrtností až 35 %, i když je zahájena adekvátní antimykotická léčba. [31]

C. albicans může tvořit různé morfortypy včetně kulaté až vejčité formy kvasinek (buňky kvasinek) a vláknité hyfové formy (hyfy). Zatímco se předpokládá, že kvasinkové buňky slouží jako hlavní morfortyp zodpovědný za distribuci a šíření *C. albicans*,

hyfy (Obrázek č.6) jsou považované za formu invazivní a infekční, která je schopna aktivně pronikat epiteliálními buňkami, usnadňovat endocytózu a stabilizovat zralé biofilmy. Kromě toho je *C. albicans* schopna provádět tzv. mechanosensing: při kontaktu s biotickým/abiotickým povrchem mohou kvasinkové buňky vyvolat tvorbu zárodečných klíčků a hyf. Kontakt s lidskou krevní plazmou je dalším důležitým spouštěčem přechodu, který podporuje morfologický posun. Přechod a souhra mezi kvasinkovými buňkami a morfotypem hyf jsou důležité pro progresi a regulaci infekčních procesů. [31]

Příspěvek těchto dvou morfotypů k adhezi a tvorbě biofilmu však stále není plně objasněn. Mnoho studií popisuje kvasinkovou fázi jako hlavní morfotyp zodpovědný za počáteční adhezi, následovanou tvorbou zárodečných klíčků vázaných na povrchu a přechodem do hyfální fáze. Jiné studie však zdůrazňují význam zárodečných klíčků/hyf pro adhezi *C. albicans* k endoteliálním a epiteliálním buňkám. Všechny tyto studie se shodují na tom, že hyfální fáze je klíčová pro tvorbu biofilmu, zatímco příspěvek různých morfotypů k počáteční adhezi je méně jasný. [31]



Obrázek č.6: Hyfa *Candida albicans*
Snímek ze světelného mikroskopu, metoda fázového kontrastu
Zvětšení: 1000x

Převzato z Correia et al., 2019 a upraveno [32]

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tato část bakalářské práce obsahuje informace o principech použitých metod, detailní popis postupu experimentů a porovnání dat získaných na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s. Hlavním cílem je zjistit, zda sonikační metoda, která se při mikrobiologické diagnostice centrálních venózních katetrů běžně nepoužívá, poskytne stejné výsledky jako rutinní metoda dle Makiho. Dílčím cílem je prověřit, jestli sonikační metoda vykazuje vyšší citlivost než Maki.

6.1 Metody zaměřené na detekci mikroorganismů formujících biofilm na extrahovaných centrálních venózních katetrech

V klinické praxi je nejrozšířenějším postupem Makiho semikvantitativní metoda. Tento postup totiž disponuje řadou výhod. Metoda je poměrně rychlá a jednoduchá na provedení, kromě sterilní pinzety nevyžaduje použití jiných speciálních pomůcek a interpretace výsledků je relativně snadná. Vždy je však potřeba dodržovat preanalytickou fázi a používat sterilní nástroje, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku.

Další metodou, kterou lze použít pro detekci biofilmu je sonikační metoda. Ta je ovšem ve srovnání s předchozím postupem náročnější na provedení i přípravu vzorku. Na druhou stranu, dle některých autorů vykazuje vyšší citlivost (až o 20 % v porovnání s Makiho metodou). Před provedením samotné metody je nutné připravit si značné množství speciálních pracovních pomůcek (sterilní pinzety, nůžky, peány a kádinku či zkumavku se sterilním roztokem, případně další pomůcky). Navíc některé laboratoře nemají k dispozici potřebné přístrojové vybavení (ultrazvuková lázeň). I zde je důležité používat výhradně sterilní pomůcky a při manipulaci s klinickým materiálem dbát zvýšené opatrnosti. [1]

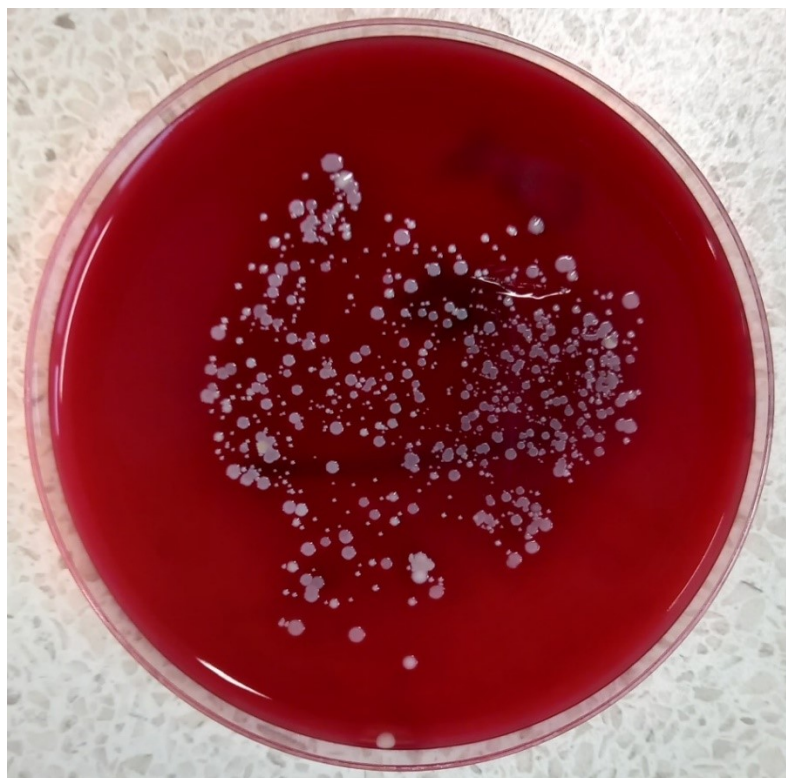
Pro uvolnění mikroorganismů z katetru do okolní tekutiny je možné také použít vortexování katetru nebo centrifugaci ve sterilním médiu. Tyto metody ovšem v praxi nenašly širší uplatnění. Pro průkaz bakterií na povrchu katetru lze využít i klasický průkaz pomocí světelného mikroskopu, v tomto případě se celý katetr obarví akridinovou oranží nebo se využije Gramovo barvení. Zde je ovšem velké omezení, tímto způsobem lze

detekovat biofilm pouze na katetrech z průhledného materiálu, navíc je tato metoda velmi pracná a obtížná na vyhodnocení, proto se běžně nevyužívá. [1]

Pokud má pacient příznaky systémové infekce krve, ošetřující lékař obvykle kromě CVK pošle na vyšetření i krev pacienta odebranou do hemokultivačních lahvíček (aerobní a anaerobní). Tyto lahvičky se v laboratoři umisťují do speciálních kultivačních přístrojů, které jsou schopné detekovat přítomnost bakterií. Standardně se zde ponechávají 5-7 dnů, avšak pokud má pacient skutečně sepsi, bakterie jsou detekovány dříve.

6.1.1 Metoda dle Maki

Jedná se o nejpoužívanější postup pro diagnostiku infekcí krevního řečiště sdružených se zavedením CVK. Tuto semikvantitativní metodu zavedl Maki a kol. v roce 1977. Principem Makiho metody je vyjmutí katetru ze zkumavky za pomoci sterilní pinzety, umístění na krevní agar a následné „poválení“ katetru po povrchu. Díky tomu dochází k obtisku biofilmu (pokud je na katetru přítomen) na agar, touto metodou lze tedy zachytit pouze bakterie osídlující zevní povrch katetru (extraluminální osídlení). Takto připravená plotna je kultivována v termostatu s řízenou atmosférou s 5% koncentrací CO₂ při 37°C po dobu 24 hodin (Obrázek č.7 – příklad pozitivního nálezu po kultivaci). Hodnotí se počet narostlých kolonií (CFU – colony forming unit). Dle Makiho je signifikantním počtem svědčícím pro infekci krevního řečiště 15 CFU, nižší hodnoty s největší pravděpodobností ukazují na kolonizaci či kontaminaci katetru. [1, 9]



Obrázek č.7: Pozitivní výsledek kultivace na krevním agaru zachycený Makiho metodou
Extraluminální kolonizace katetru

*Snímek pořízen na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.
(Zdroj: Karolína Bugnová)*

Jak je uvedeno výše, tato metoda slouží k odhalení infekce spojené s extraluminálním osídlením katetru. Pro zachycení mikroorganismů z intraluminální části katetru se v praxi používá jeho kultivace v játrovém bujónu, kde se bakterie pomnoží. Ten se nechá kultivovat v termostatu s normální atmosférou (37°C, 24 hodin). Potom se část tekutiny odebere jednorázovou Pasteurovou pipetou a vyočkuje se na krevní agar technikou křížového roztěru.

6.1.2 Metoda sonikace

Principem této metody je mechanické porušení mikrobiálního biofilmu, který se vytvořil na povrchu cizorodého materiálu, působením ultrazvukových vln. Jakmile dojde k porušení struktury biofilmu, bakterie se uvolňují do okolní tekutiny a vzniká tzv. sonikát. Samotná sonikace probíhá v ultrazvukové čističce neboli ultrazvukové lázni (Obrázek č.8) po dobu pěti až deseti minut. [1]



Obrázek č.8: Ultrazvuková čistička naplněná destilovanou vodou
Vzorek s katetrem umístěn v plastovém stojanu

*Snímek pořízen na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.
(Zdroj: Karolína Bugnová)*

Tomuto kroku ovšem předchází příprava vzorku. Cizorodý materiál se nejprve musí umístit do sterilní kádinky pomocí sterilní pinzety či peánu. Následně se do kádinky nalije sterilní Ringerův roztok a vrchní část kádinky se utěsní pomocí sterilní hliníkové fólie. Vzhledem k tomu, že vše musí probíhat za přísně aseptických podmínek, tato příprava se uskutečňuje v laminárním boxu.

U této metody je kvantita hodnocena podobně jako u Makiho metody, určujícím kritériem je tedy opět počet narostlých kolonií, avšak hraniční hodnota se u obou metod liší. V tomto případě je za signifikantní kolonizaci katetru považován průkaz více než 100 CFU, nižší hodnoty jsou pravděpodobně důkazem kontaminace nebo klinicky nevýznamné kolonizace katetru.

Tímto způsobem se zpracovávají především totální endoprotézy (TEP) při reimplantacích. Pokud je TEP infikována, dochází k uvolnění implantátu od kosti, tím i k jeho selhání a musí být z těla odstraněn. Běžné kultivační metody nejsou pro tento typ materiálu dostatečně citlivé a vzhledem velikosti a tvaru jednotlivých komponent prakticky neproveditelné, z těchto důvodů je využívána právě sonikace.

Na rozdíl od TEP (Obrázek č.9) mají katetry tvar, který umožňuje využít běžnou kultivační techniku, navíc lze jejich délku upravit pomocí sterilních nůžek tak, aby se mohly umístit na agar a celá jejich plocha se rolováním otiskla. Proto se v praxi pro diagnostiku infekcí sdružených se zavedením katetrů rutinně uplatňuje právě rychlejší a jednodušší Makiho metoda, zatímco sonikační metoda se pro tyto účely používá minimálně. V mikrobiologické laboratoři Nemocnice Šumperk a.s. se sonikace využívá pouze při zpracování TEP a intrauterinních tělísek, ale nikoliv u CVK.



Obrázek č.9: Komponenty totální endoprotézy

*Snímek pořízen na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.
(Zdroj: Karolína Bugnová)*

6.1.3 Identifikace mikroorganismů pomocí instrumentace MALDI-TOF MS

Instrumentace MALDI-TOF MS (Matrix–Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, hmotnostní spektrometr s laserovou desorpcí/ionizací za přítomnosti matrice s detekcí hmotnosti průletovým analyzátozem) je jeden z nejpoužívanějších a nejrychlejších přístrojů pro identifikaci mikrobů ve zdravotnictví. [33]

Tento přístroj se skládá z několika základních částí: laseru, průletové komory a detektoru. Nejprve laserový paprsek dopadá na destičku, na kterou je aplikován vzorek s matricí. Matrice zprostředkuje přeměnu energie laseru na ionizační impuls, který způsobí ionizaci molekul analytu. Pomocí napětí jsou ionty urychleny a je měřena doba jejich letu komorou. Čím jsou dané ionty menší a jejich náboj větší, tím je jejich rychlost vyšší. Detektor jednotlivé ionty zachytí a převede na elektrický signál. V závislosti na době letu je vypočten poměr hmotnosti a náboje. Výstupem je hmotnostní spektrum vzorku, které se porovnává s knihovnou spekter jednotlivých kmenů mikroorganismů. [33]

6.2 Metodika výzkumu

Výzkum probíhal v mikrobiologické laboratoři Nemocnice Šumperk a.s., dle standardního operačního postupu jsou zde všechny CVK zpracovány metodou Maki a následnou kultivací katetru v játrovém bujónu. Tento způsob umožňuje detekovat mikroorganismy osídlující jak vnější, tak i vnitřní povrch katetru. Interpretace nálezu je poměrně jednoduchá. Pokud je Makiho metodou zachycen nějaký mikroorganismus a kultivace v játrovém bujónu odhalí přítomnost stejného kmene, jedná se patrně o extraluminální osídlení katetru. V případě, že je mikrob detekován pouze v játrovém bujónu a Makiho metodou se žádný mikroorganismus neprokáže, je pravděpodobné, že katetr byl kolonizován intraluminálně (případně extraluminálně, ale v tak malém množství, které nebylo možné Makiho metodou zachytit).

U sonikační metody nelze odlišit extraluminální a intraluminální osídlení povrchu katetru mikroorganismy, protože ultrazvukové vlny vyvolají uvolnění adherovaných bakterií z celé plochy CVK. Tato nevýhoda není pro identifikaci původce infekce tak zásadní, důležité je především zjištění přítomnosti mikroba a jeho kvantita. I v tomto

případě se po samotné sonikaci využívá následná kultivace v játrovém bujónu, která zajistí pomnožení a tím i detekci velmi malého počtu bakterií z původního vzorku.

6.2.1 Použitý materiál

Přístroje a pomůcky:

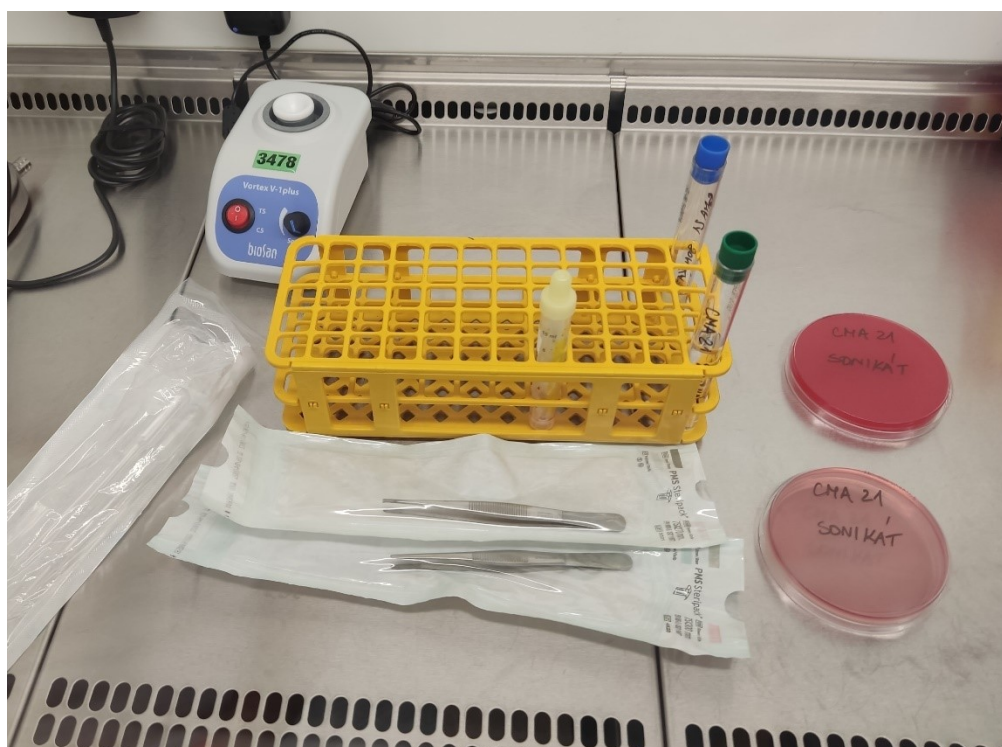
- Laminární box MSC ADVANTAGE (ThermoFisher Scientific, USA)
- Ultrazvuková čistička DK-360 HT (ULTRAZVUK, s.r.o., ČR)
- MALDI-TOF (Bruker Corporation, USA)
- VORTEX V-1 plus (SIA Biosan, Litva)
- Termostat s řízenou atmosférou Thermo Elektron (5% CO₂), teplota 36±1°C (ThermoFisher Scientific, USA)
- Termostat bez řízené atmosféry Heratherm, teplota 36±1°C (ThermoFisher Scientific, USA)
- Bunsenův plynový kahan (Karl Hecht GmbH & Co KG, Německo)
- Laboratorní kličky kovové (Biotool Service GmbH, Švýcarsko)
- Jednorázové sterilní plastové 10μl kličky (Heathrow Scientific LLC, USA)
- Jednorázové sterilní Pasteurovy pipety (Heathrow Scientific LLC, USA)
- Sterilní pinzety (WITTEX GmbH, Německo)
- Sterilní nůžky (WITTEX GmbH, Německo)
- Stojánky na zkumavky (ThermoFisher Scientific, USA)

Reagencie a kultivační média:

- Fyziologický roztok 5ml (VIAMAR International, s.r.o., ČR)
- Játrový bujón 5ml (VIAMAR International, s.r.o., ČR)
- Krevní agar Columbia (VIAMAR International, s.r.o., ČR)
- MacConkey agar (VIAMAR International, s.r.o., ČR)
- Antibiotické disky (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

6.2.2 Postup zpracování centrálních venózních katetrů

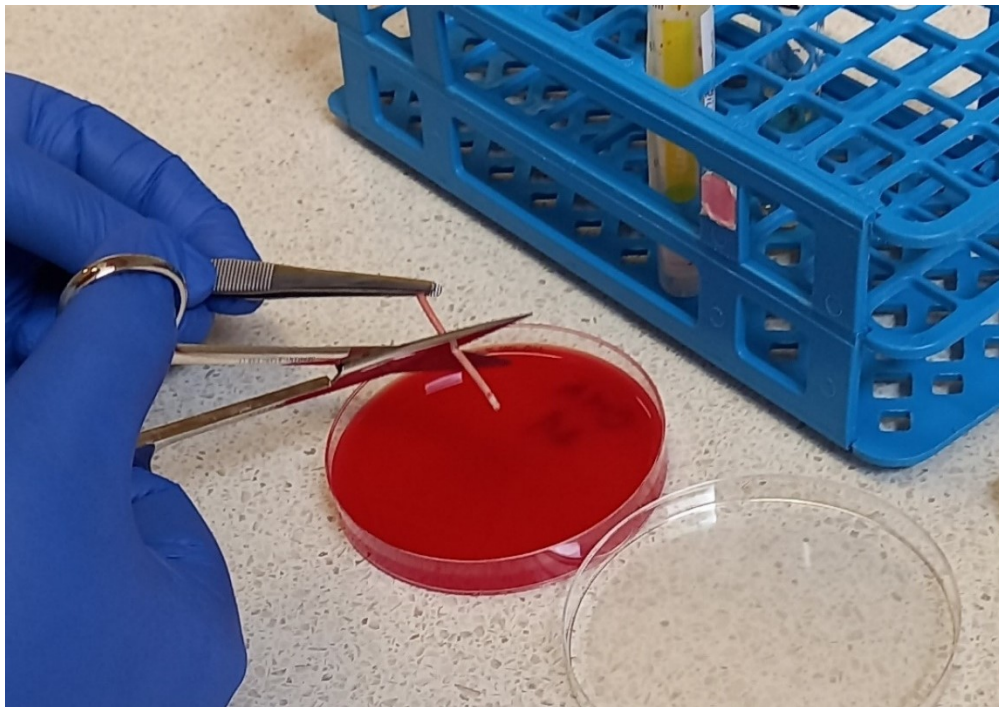
Z jednotlivých lůžkových oddělení Nemocnice Šumperk a.s. byly do mikrobiologické laboratoře dodávány vzorky CVK. Laboratoř požaduje zaslání tohoto typu materiálu ve sterilní suché zkumavce bez transportního média. Po zápisu žádanky do laboratorního informačního systému a označení vzorku originálním štítkem se základními údaji pacienta a specifickým čárovým kódem, byl klinický materiál poslán ke zpracování do příslušného úseku laboratoře. Všechny katetry byly okamžitě zpracovány v laminárním boxu, aby se předešlo kontaminaci a znehodnocení vyšetřovaného vzorku.



Obrázek č.10: Pomůcky pro přípravu vzorku na sonikaci
Fyziologický roztok, játrový bujón, krevní agar, MacConkey agar, jednorázové pipety, sterilní pinzety a stojánek

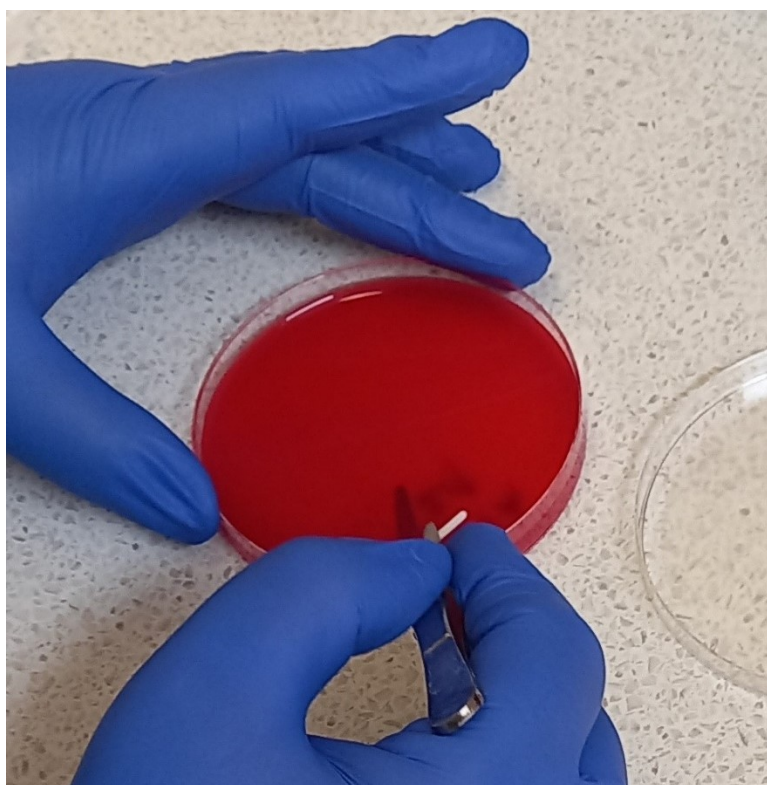
*Snímek pořízen na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.
(Zdroj: Karolína Bugnová)*

Prvním krokem byla příprava všech potřebných pomůcek (Obrázek č.10), včetně živných půd a napuštění ultrazvukové lázně destilovanou vodou. CVK byl vyjmut sterilní pinzetou ze zkumavky a pomocí sterilních nůžek rozdělen na dvě části (Obrázek č.11). Distální konec katetru byl zpracován standardně Makiho metodou. Katetr byl 5x poválen na krevním agar (Obrázek č.12) tak, aby se obsáhla co největší plocha a poté byl vložen do játrového bujónu k pomnožení adherovaných mikroorganismů. Krevní agar byl uložen do termostatu s řízenou atmosférou s 5% koncentrací CO₂ a kultivován při teplotě 36±1°C, játrový bujón do termostatu s normální atmosférou (36±1°C). Po 24hodinové kultivaci bujónu z něj byla odebrána část tekutiny, která byla vyočkována na krevní a MacConkey agar. Očkování půd probíhalo následovně: nejprve byla použita jednorázová, sterilní 10μl klička, kterou se vytvořilo inokulum a následně se provedl křížový roztěr pomocí vyžíhaných bakteriologických kliček, na krevní agar se přes první křížení a tzv. hádek nanasla stafylokoková čára, následně se na stafylokokovou čáru a současně do místa prvního křížení umístil antibiotický disk bacitracinu. Takto připravené půdy se nechaly kultivovat do druhého dne v termostatu s 5% koncentrací CO₂ při teplotě 36±1°C.



Obrázek č.11: Rozstřížení katetru na dvě části

*Snímek pořízen na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.
(Zdroj: Karolína Bugnová)*



Obrázek č.12: Makiho metoda (rolování katetru po agaru)

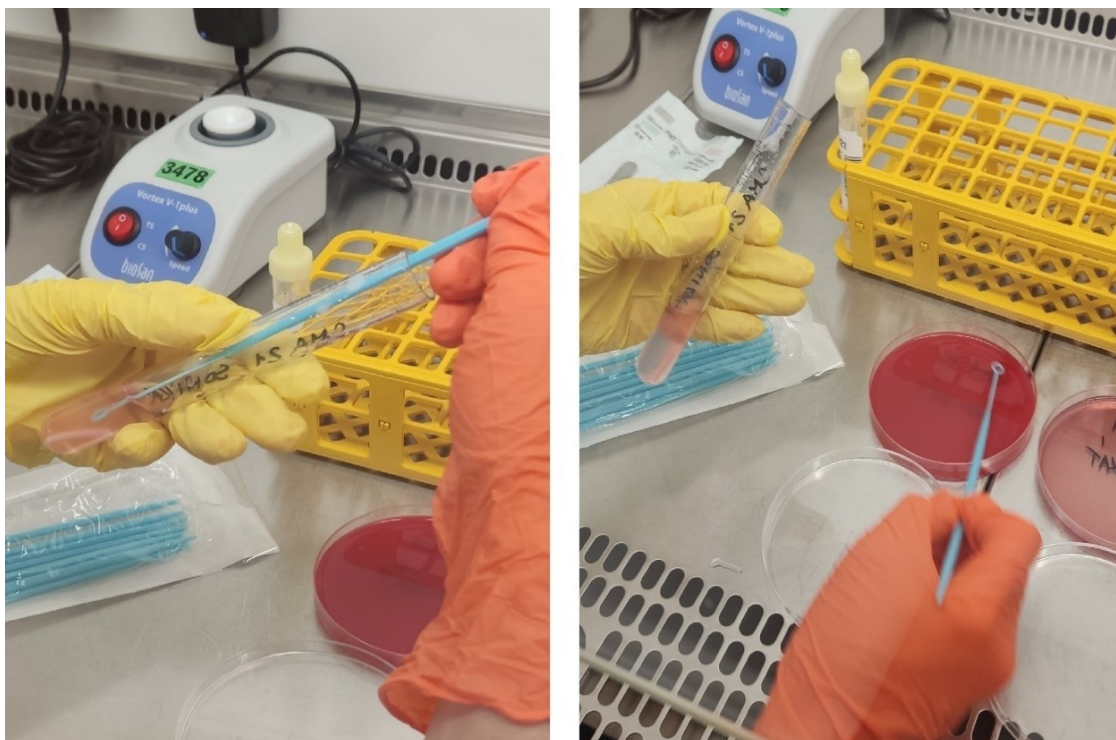
*Snímek pořízen na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.
(Zdroj: Karolína Bugnová)*

Zbylá část katetru byla použita pro zpracování metodou sonikace. Pro sonikaci byl z ekonomických důvodů použit místo Ringerova roztoku roztok fyziologický. Před vložením CVK do sterilního fyziologického roztoku byl jeho objem upraven podle délky vyšetřovaného katetru. Jednorázovou sterilní Pasteurovou pipetou byla část roztoku odebrána tak, aby byl vložený katetr zcela ponořen a zároveň aby hladina ultrazvukové lázně nepřesahovala hladinu fyziologického roztoku. Na dno zkumavky s fyziologickým roztokem byl za pomoci sterilní pinzety vložen katetr (Obrázek č.13). Celá zkumavka byla následně umístěna do plastového stojanu, který se vložil do ultrazvukové lázně napuštěné destilovanou vodou. Ultrazvukové vlny působily na vzorek po dobu 5 minut.



Obrázek č.13: Vložení katetru do zkumavky s fyziologickým roztokem
Snímek pořízen na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.
(Zdroj: Karolína Bugnová)

Po dokončení sonikace byl stojan i se vzorkem vyjmut a ultrazvuková lázeň byla vypuštěna. Ze sonikátu se jednorázovou sterilní bakteriologickou kličkou odebralo 10 μ l tekutiny, která se aplikovala na krevní a následně i na MacConkey agar (Obrázek č.14). K rozočkování byla opět využita technika křížového roztěru a na krevní agar nanesena stafylokoková čára s diskem bacitracinu. Pomocí jednorázové sterilní pipety se odebral 1ml sonikátu, který se aplikoval do játrového bujónu. MacConkey agar s játrovým bujónem byl umístěn do termostatu s normální atmosférou ($36\pm 1^{\circ}\text{C}$) a krevní agar do termostatu s 5% koncentrací CO_2 ($36\pm 1^{\circ}\text{C}$). Kultivace probíhala 24 hodin, po této době byl játrový bujón dále zpracován stejně jako u Makiho metody (Obrázek č.15).



Obrázek č.14: Očkování sonikátu na živné půdy

*Snímek pořízen na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.
(Zdroj: Karolína Bugnová)*



**Obrázek č.15: Pozitivní nález získaný kultivací po vyočkování játrového bujónu,
ve kterém byl kultivován sonikát**

*Snímek pořízen na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.
(Zdroj: Karolína Bugnová)*

7. VÝSLEDKY A POROVNÁNÍ NÁLEZŮ ZÍSKANÝCH MAKIHO METODOU A SONIKAČNÍ METODOU

Na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s. bylo za období od 25.8. 2021 do 21.2. 2022 zpracováno 11 centrálních venózních katetrů metodou Maki a sonikace. Výsledky byly porovnány pouze z hlediska kvality nikoliv kvantity. Vzhledem k postupu experimentu, ve kterém se musela zachovat metodika zpracování CVK dle Makiho, nebylo možné získaná data srovnat kvantitativně.

Pacienti, kterým byl CVK zaveden, jsou hospitalizováni na různých lůžkových odděleních Nemocnice Šumperk a.s., nejčastěji se jedná o resuscitační a chirurgické oddělení a jednotky intenzivní péče. Z níže uvedené tabulky č.1 je zřejmé, že katetrizovanými pacienty jsou v drtivé většině lidé vyššího věku (>60 let). Přestože jsou uvedené diagnózy poměrně pestré, ve většině případů se jedná o závažný zdravotní stav pacienta, který nesporně vyžaduje zavedení CVK z důvodu rychlého žilního přístupu. Převážná část pacientů s indikovanou katetrizací je v nemocnici hospitalizována z důvodu kardiovaskulárních onemocnění, respiračního selhávání nebo jde o pacienty s chronickou chorobou (často onkologičtí pacienti).

Tabulka č.1: Přehled katetrizovaných pacientů z jednotlivých lůžkových oddělení Nemocnice Šumperk a.s. z hlediska věku a diagnózy

Číslo pacienta	Označení vzorku	Věk pacienta	Oddělení	Diagnóza
1	CMA/91	-	Resuscitační oddělení	Chronická ischemická choroba srdeční
2	CMA/92	44	Chirurgie	Úrazové subdurální krvácení
3	CMA/93	72	Resuscitační oddělení	Srdeční zástava s úspěšnou resuscitací
4	CMA/97	82	Chirurgie	Zhoubný novotvar předstojné žlázy
5	CMA/104	56	Dlouhodobá intenzivní ošetrovatelská péče	Jiné určené poruchy mozku
6	CMA/106	63	Resuscitační oddělení	Bezvědomí (kóma)
7	CMA/108	88	Interna	Pneumonie
8	CMA/109	63	Následná intenzivní péče	Akutní respirační selhání
9	CMA/5	66	Resuscitační oddělení	Jiná virová pneumonie
10	CMA/6	71	Následná intenzivní péče	Akutní respirační selhání
11	CMA/21	80	Chirurgie	Zhoubný novotvar – horní zevní kvadrant prsu

Následující tabulka č.2 poskytuje přehledně popsané nálezy u jednotlivých pacientů, ve sloupcích jsou uvedeny metody, které byly využity pro detekci mikroorganismů formujících biofilm na centrálních venózních katetrech. Každý řádek reprezentuje jednoho konkrétního pacienta.

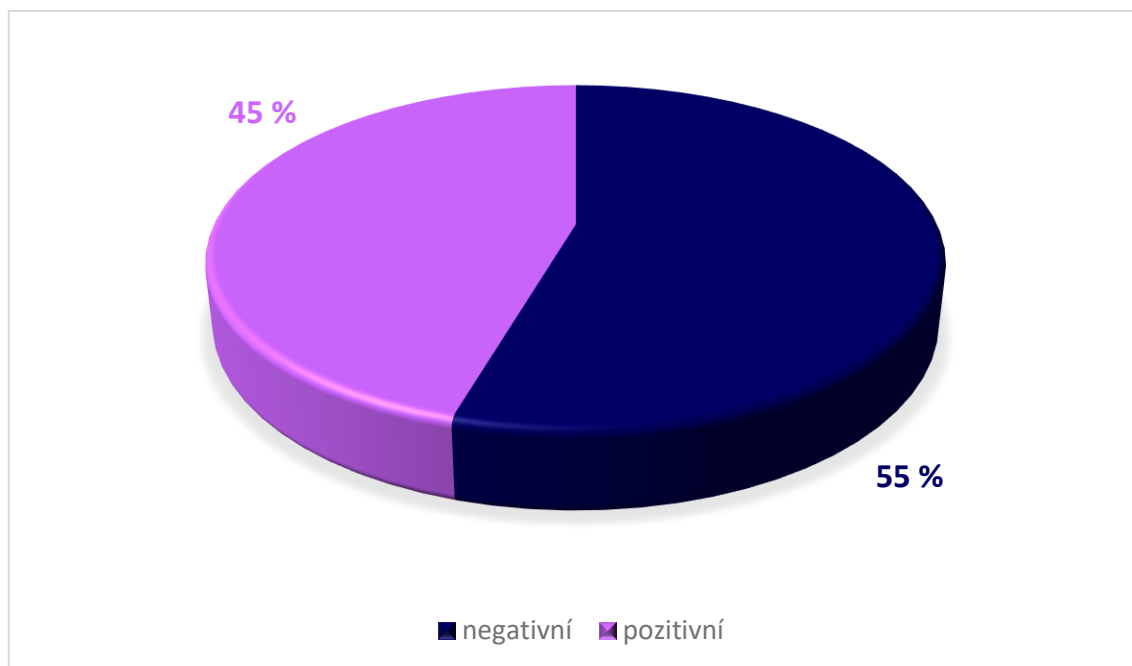
Tabulka č.2: Přehled získaných výsledků kultivace biofilm formujících mikroorganismů osídlující centrální venózní katetry. Hodnocení bylo provedeno Makiho a sonikační metodou, na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.

Číslo pacienta	Označení vzorku	Maki primokultivace	Maki pomnožení	Sonikace primokultivace	Sonikace pomnožení
1	CMA/91	Bez nálezu	Bez nálezu	Bez nálezu	Bez nálezu
2	CMA/92	Bez nálezu	Bez nálezu	Bez nálezu	Bez nálezu
3	CMA/93	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	CMA/97	<i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>
5	CMA/104	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
6	CMA/106	Bez nálezu	Bez nálezu	Bez nálezu	Bez nálezu
7	CMA/108	Bez nálezu	Bez nálezu	Bez nálezu	Bez nálezu
8	CMA/109	Bez nálezu	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Bez nálezu	<i>Lactobacillus paracasei</i>
9	CMA/5	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Bez nálezu	Bez nálezu
10	CMA/6	Bez nálezu	Bez nálezu	Bez nálezu	Bez nálezu
11	CMA/21	Bez nálezu	Bez nálezu	Bez nálezu	Bez nálezu

Z celkového počtu 11 vzorků bylo 6 vzorků vyhodnoceno, a to jak metodou Maki, tak sonikační metodou, jako negativní (počet narostlých kolonií < 15 CFU), viz. graf č.1. U vzorku pacienta č.8 byl zaznamenán negativní výsledek a to jak po primokultivaci sonikační, tak i Makiho metodou. Avšak kultivace v pomnožovacích játrových bujónech odhalila přítomnost *Lactobacillus paracasei*, z čehož lze usoudit, že se pravděpodobně jednalo o intraluminální kolonizaci katetru. V případě vzorku získaného od pacienta č.3 byl primokultivací zjištěn výskyt bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, zatímco po pomnožení v játrovém bujónu byla nalezena *Klebsiella pneumoniae*, což svědčí o skutečnosti, že se extraluminální osídlení od intraluminálního liší. U vzorků získaných

od pacientů č.4 a č.5 byly nálezy pozitivní a shodovaly se u obou kultivačních postupů (primokultivace na krevním a MacConkey agaru, pomnožení v játrovém bujónu), z čehož vyplývá, že daný mikroorganismus kolonizuje jak vnitřní, tak vnější povrch katetru.

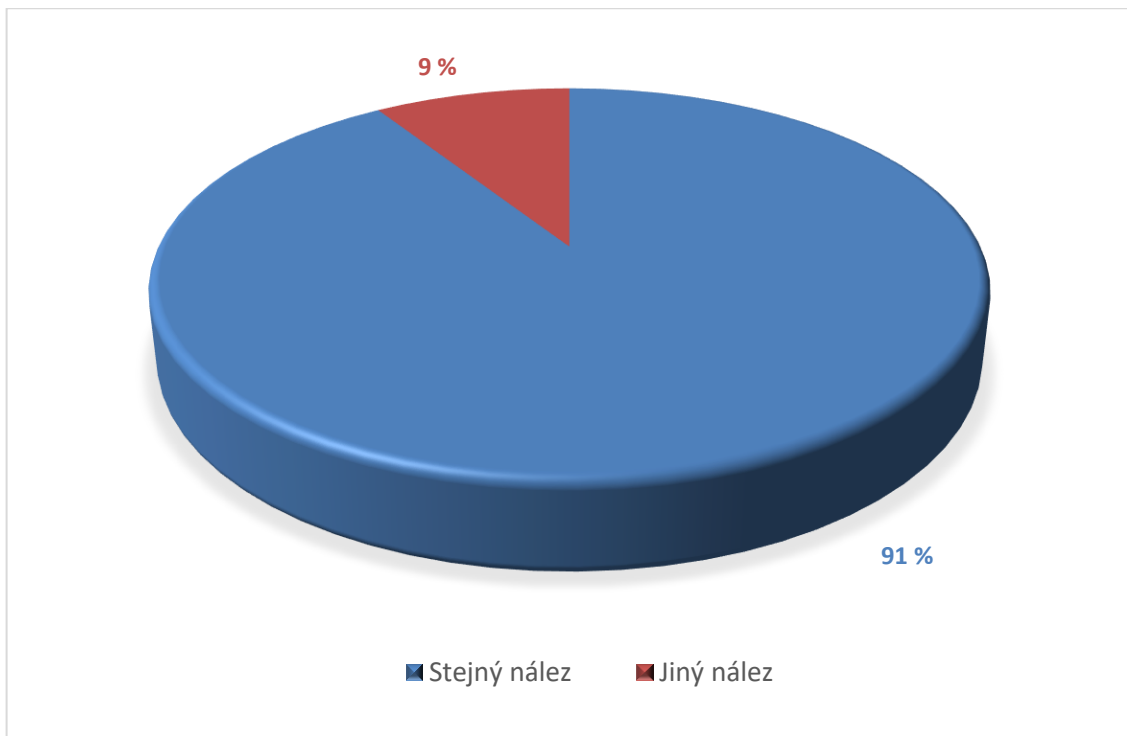
Graf č.1: Procentuální zastoupení pozitivních a negativních nálezů z 11 zkoumaných vzorků centrálních venózních katetrů, zpracovaných na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.



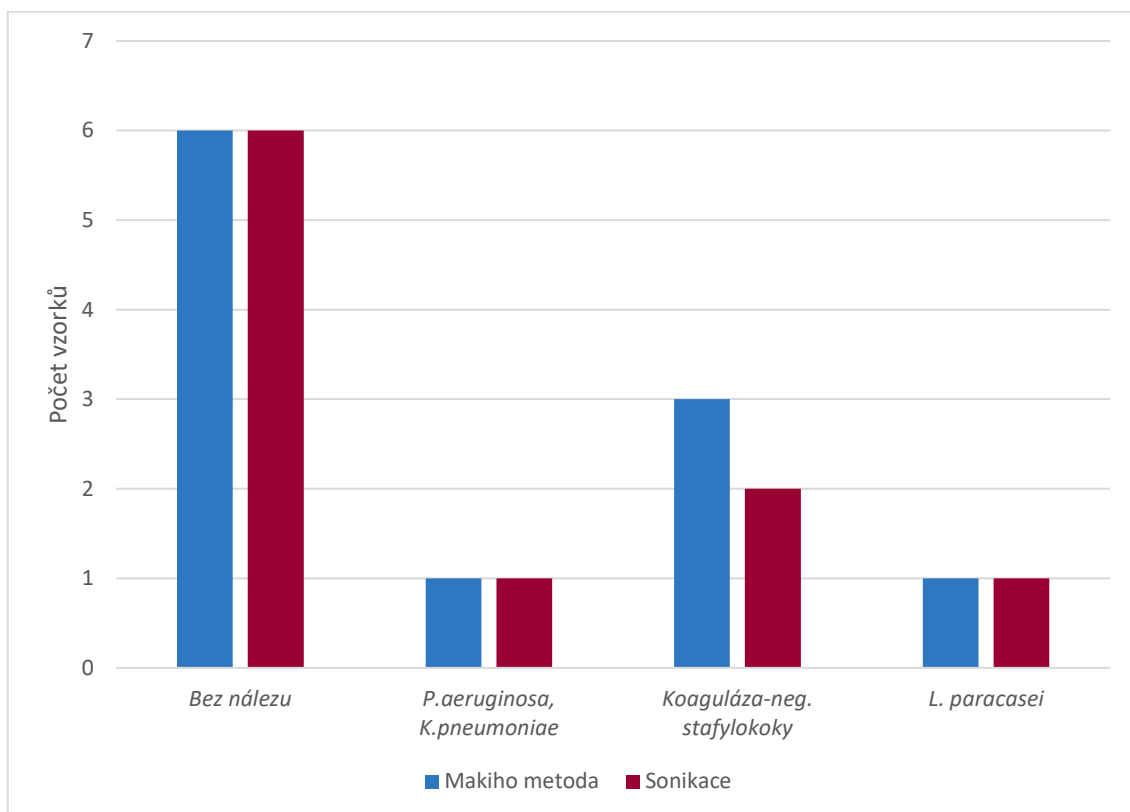
Při kvalitativním srovnání nálezů získaných Makiho a sonikační metodou, byla zjištěna shoda u 10 zkoumaných vzorků (graf č.2). Pouze u pacienta č.9 byl sonikační metodou zaznamenán negativní výsledek. Nicméně, u tohoto vzorku byla Makiho metodou odhalena přítomnost bakterie *Staphylococcus haemolyticus*. Tato diskrepance byla nejspíše způsobena delší časovou prodlevou mezi dodáním vzorku do laboratoře a jeho zpracováním metodou sonikace, zatímco Makiho metoda byla provedena ihned po dodání vzorku. V jednom případě (pacient č.4) byl dokonce detekován polydruhový biofilm, tvořený bakteriemi *Staphylococcus hominis* a *Staphylococcus epidermidis*. Z 5 pozitivních nálezů byly 3 reprezentovány zástupci koaguláza-negativních stafylokoků (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*). Porovnání jednotlivých druhů nálezů mezi Makiho metodou a sonikací znázorňuje graf č.3. Ve všech pozitivních případech byly zachyceny mikroorganismy spadající pouze do kategorie bakterií. Naopak, ani v jednom

případě nebyl zachycen *Staphylococcus aureus* nebo *Candida* spp., kteří jsou jedni z nejobávanějších původců infekcí krevního řečiště sdružených se zavedením CVK.

Graf č.2: Míra shody u zkoumaných vzorků získaných metodou Maki a sonikační metodou z centrálních venózních katetrů. Šetření bylo provedeno na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.



Graf č.3: Kvalitativní srovnání nálezů u centrálních venózních katetrů, získaných Makiho metodou a sonikací na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.



8. DISKUSE

Cílem této bakalářské práce je poskytnout základní informace o problematice infekcí cévního řečiště asociovaných se zavedením centrálního venózního katetru a původců těchto onemocnění, jimiž jsou mikroorganismy schopné tvořit biofilm. Hlavním záměrem této práce bylo paralelní provedení Makiho metody a sonikace u vyšetřovaných vzorků a kvalitativní porovnání získaných dat. Následná identifikace izolovaných mikrobiálních kultur byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF.

Hlavním cílem bylo zjistit, zda sonikační metoda, která se primárně používá pro šetření mikrobiálního zatížení TEP, poskytuje stejné výsledky, jako rutinně používaná Makiho metoda, a zda by tedy bylo teoreticky možné Makiho metodu využívanou pro analýzu CVK nahradit metodou sonikace. Jedna z pracovních hypotéz byla postavena na tom, že pomocí sonikační metody, která pro rozrušení biofilmu využívá ultrazvukových vln, by se mohlo dosáhnout záchytu i jiných mikroorganismů, které by se konvenční Makiho metodou nemusely odhalit. Za tímto účelem bylo analyzováno 11 vzorků katetrů, které byly transportovány do laboratoře z různých lůžkových oddělení Nemocnice Šumperk a.s.

Z výsledků analýzy vyplývá, že data získaná prostřednictvím sonikace v 91 % případů korelují s daty získanými Makiho metodou. Pouze v jednom případě (což odpovídá 9 %) se nález u obou metod lišil, což bylo s největší pravděpodobností způsobeno delší časovou prodlevou mezi přijetím vzorku laboratoří a jeho zpracováním sonikační metodou (Makiho metoda však byla provedena okamžitě). Na základě získaných výsledků lze usoudit, že sonikační metodu by bylo možné použít jako alternativu k Makiho metodě. Dále bylo zjištěno, že sonikací nebyl ani v jednom případě detekován mikroorganismus, jehož přítomnost by Makiho metoda neodhalila. Tímto výzkumem se tedy nepodařilo prokázat, že by sonikace v porovnání s Makiho metodou vykazovala vyšší citlivost. Pro obecnější závěry by bylo nutné zanalyzovat větší počet pozitivních vzorků, ale z důvodu velké vytíženosti laboratoře to nebylo možné.

V případě negativních nálezů získaných Makiho metodou byla zaznamenána 100% shoda s výsledky získanými sonikací. Což svědčí o tom, že byla dodržena správná

laboratorní praxe a ani v jednom z těchto případů nedošlo ke kontaminaci vzorku během jeho zpracování.

Výsledky získané tímto výzkumem korelují se závěry některých novějších studií zabývajících se problematikou infekcí sdužených se zavedením katetrů. Například v americké studii (*Erb et al., 2014*) porovnávající sonikační a Makiho metodu v souvislosti s diagnostikou infekcí asociovaných se zavedením CVK nebyl potvrzen profit sonikace oproti rolovací Makiho metodě. Autoři této studie poukazují na předpokládanou vyšší citlivost sonikační metody, tato metoda umožňuje zachytit bakterie kolonizující intraluminální povrch katetru, které Makiho metodou odhalit nelze. Zajímavé je, že oba tyto postupy jsou v USA pro diagnostiku infekcí sdužených se zavedením katetru schváleny Centrem pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) a Společností pro infekční nemoci Ameriky (IDSA, Infectious Diseases Society of America). [34]

Dalším příkladem je studie týmu nizozemských vědců, který srovnával sonikaci a metodu dle Maki u dlouhodobě zavedených tunelizovaných katetrů (*Slobbe et al., 2009*), přičemž došel k podobnému závěru. Výzkum byl proveden na vzorcích katetrů od hematologických pacientů převážně s diagnostikovanou akutní myeloidní leukémií nebo myelodysplastickým syndromem. Výsledky získané oběma metodami byly v převážné většině shodné, ale vyšší citlivost sonikační metody opět prokázána nebyla. [35]

Oba výše uvedené vědecké týmy zvolily přístup randomizované studie, kdy asi jednu polovinu vzorků zpracovaly nejprve Makiho metodou a následně sonikací, u druhé poloviny vzorků bylo pořadí metod opačné. Tímto způsobem bylo docíleno rovných podmínek pro hodnocení obou metodických přístupů. Obě studie odhalily, že metoda, která byla provedena jako první, měla ve srovnání s druhou metodou vyšší citlivost.

K zajímavému zjištění dospěla výzkumná skupina španělských vědců (*Guembe et al., 2016*), která zkoumala přínos sonikační metody u vzorků vícelumenových katetrů. V tomto výzkumu byla nejdříve provedena Makiho rolovací metoda a následně sonikace. Získaná data nepotvrdila vyšší přínos sonikační metody v rámci celé sledované skupiny pacientů, avšak v případě pacientů s diagnostikovanou

infekcí krevného řečiště bylo prokázáno, že je sonikační metoda téměř o 30 % citlivější než Maki. Dle názorů autorů se tyto metody vzájemně doplňují a sonikaci doporučují pouze u pacientů s potvrzenou bakteriemií neznámého původu a současně s negativním kultivačním nálezem u Makiho metody. [36]

9. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na problematiku mikrobiálních biofilmů osídlujících centrální venózní katetry a s tím souvisejících infekcí krevního řečiště. Cílem bylo porovnání dvou metodických přístupů pro zjištění přítomných mikroorganismů na povrchu CVK. Rutinně používaná Makiho metoda byla srovnána se sonikační metodou, která se standardně pro diagnostiku infekcí CVK nepoužívá. Získaná data byla hodnocena kvalitativně a identifikace nálezů se prováděla hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF.

Z celkového počtu 11 vzorků se u 91 % z nich prokázal stejný výsledek v obou použitých metodách. Pouze v jednom případě (9 %) shoda prokázána nebyla. U pěti pozitivních vzorků CVK byl zjištěn výskyt totožných kmenů bakterií. Jako nejčastější původci byly identifikováni koaguláza-negativní stafylokoky, dalšími zjištěnými kmeny byly *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* a *Lactobacillus paracasei*. Ani v jednom případě nebyl sonikační metodou identifikován mikroorganismus, který by nezachytila i Makiho metoda.

Vyšší citlivost sonikační metody při srovnání s Makiho metodou využívanou pro analýzu vzorků CVK nebyla prokázána. Dle získaných výsledků, které byly v drtivé většině případů shodné, by však sonikace mohla konkurovat rutinní Makiho metodě.

10. POUŽITÉ ZKRATKY

CDC	Centers for Disease Control and Prevention, Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
CFU	colony forming unit, kolonie tvořící jednotky
CoNS	coagulase-negative staphylococci, koaguláza-negativní stafylokoci
CVK	centrální venózní katetr/y
EPS	extracelulární polymerní matrice
IDSA	Infectious Diseases Society of America, Společnost pro infekční nemoci Ameriky
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight, laserová desorpce/ionizace za pomoci matrice s využitím analyzátoru doby letu
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
QS	<i>quorum sensing</i> , mechanismus mezibuněčné komunikace mezi mikroorganismy
TEP	totální endoprotéza/y

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka č.1: Přehled katetrizovaných pacientů z jednotlivých lůžkových oddělení Nemocnice Šumperk a.s. z hlediska věku a diagnózy	39
Tabulka č.2: Přehled získaných výsledků kultivace biofilm formujících mikroorganismů osídlujících centrální venózní katetry. Hodnocení bylo provedeno Makiho a sonikační metodou na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s.	40

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č.1: Snímek biofilmu tvořený bakterií <i>Staphylococcus aureus</i> na intraluminálním povrchu katetru zachycený elektronovou mikroskopií	13
Obrázek č.2: Základní fáze vývoje biofilmu	15
Obrázek č.3: Možné zdroje infekcí sdružených se zavedením centrálního venózního katetru	19
Obrázek č.4: Kolonie <i>Staphylococcus epidermidis</i> na krevním agaru	22
Obrázek č.5: Mikroskopický preparát <i>Staphylococcus aureus</i> obarvený dle Grama	24
Obrázek č.6: Hyfy <i>Candida albicans</i>	25
Obrázek č.7: Pozitivní výsledek kultivace na krevním agaru zachycený Makiho metodou	28
Obrázek č.8: Ultrazvuková čistička naplněná destilovanou vodou	29
Obrázek č.9: Komponenty totální endoprotézy	30
Obrázek č.10: Pomůcky pro přípravu vzorku na sonikaci	33
Obrázek č.11: Rozstřížení katetru na dvě části	34
Obrázek č.12: Makiho metoda (rolování katetru po agaru)	35
Obrázek č.13: Vložení katetru do zkumavky s fyziologickým roztokem	36
Obrázek č.14: Očkování sonikátu na živné půdy	37
Obrázek č.15: Pozitivní nález získaný kultivací po vyočkování játrového bujónu, ve kterém byl kultivován sonikát	37

13. SEZNAM GRAFŮ

- Graf č.1: Procentuální zastoupení pozitivních a negativních nálezů z 11 zkoumaných vzorků centrálních venózních katetrů, zpracovaných na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s. 41
- Graf č.2: Míra shody u zkoumaných vzorků získaných metodou Maki a sonikační metodou z centrálních venózních katetrů. Šetření bylo provedeno na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s. 42
- Graf č.3: Kvalitativní srovnání nálezů u centrálních venózních katetrů získaných Makiho metodou a sonikací na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Šumperk a.s. 43

14. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] RULÍK, Martin. *Mikrobiální biofilmy*. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. ISBN 978-80-244-2747-8.
- [2] JAMAL, Muhsin, Ufaq TASNEEN, Tahir HUSSAIN, Saadia ANDLEEB. Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *Research & reviews: Journal of microbiology and biotechnology* [online]. 2015, 4(3), 1-15 [cit. 2022-04-30]. ISSN 2320-3528. Dostupné z: <https://www.rroi.com/open-access/bacterial-biofilm-its-composition-formation-and-role-in-human-infections.pdf>
- [3] DONLAN, Rodney M., Ricardo MURGA, Michael BELL, Cristiana M. TOSCANO, Janice H. CARR, Thomas J. NOVICKI, C. ZUCKERMAN, Lawrence COREY, Jean M. MILLER. Protocol for Detection of Biofilms on Needleless Connectors Attached to Central Venous Catheters. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2001, 39(2), 750-753 [cit. 2022-05-08]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: [file:///C:/Users/trune/Downloads/Protocol for Detection of Biofilms on Needleless C.pdf](file:///C:/Users/trune/Downloads/Protocol%20for%20Detection%20of%20Biofilms%20on%20Needleless%20C.pdf)
- [4] FONG, Jiunn N. C., Fitnat H. YILDIZ, Mahmoud GHANNOUM, Matthew PARSEK, Marvin WHITELEY, Pranab MUKHERJEE. Biofilm Matrix Proteins. *Microbiology Spectrum* [online]. 2015, 3(2) [cit. 2021-11-25]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4480581/>
- [5] LIMOLI, Dominique H., Christopher J. JONES, Daniel J. WOZNIAK, Mahmoud GHANNOUM, Matthew PARSEK, Marvin WHITELEY, Pranab MUKHERJEE. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiology Spectrum* [online]. 2015, 3(3) [cit. 2021-11-24]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4657554/>
- [6] TIELKER, Denis, Stephanie HACKER, Remy LORIS, Martin STRATHMANN, Jost WINGENDER, Susanne WILHELM, Frank ROSENAU, Karl-Erich JAEGER. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* [online]. 2005, 151(5), 1313-1323

- [cit. 2021-11-25]. ISSN 1350-0872. Dostupné z:
<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/151/5/mic1511313.pdf?expires=1652206492&id=id&accname=guest&checksum=B6C2C5BA80E9871F58CBF9F2CDD5878D>
- [7] ROY, Ranita, Monalisa TIWARI, Gianfranco DONELLI, Vishvanath TIWARI. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* [online]. 2018, 9(1), 522-554 [cit. 2021-11-25]. ISSN 2150-5594. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5955472/pdf/kvir-09-01-1313372.pdf>
- [8] KARAGULER, Turhan, Hasan KAHRAMAN, Melek TUTER. Analyzing effects of ELF electromagnetic fields on removing bacterial biofilm. *Biocybernetics and Biomedical Engineering* [online]. 2017, 37(2), 336-340 [cit. 2022-05-08]. ISSN 02085216. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/314257428_Analyzing_effects_of_ELF_electromagnetic_fields_on_removing_bacterial_biofilm
- [9] Čermák, Pavel. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. 1. vydání. Praha: Maxdorf, 2008. ISBN 978-80-7345-142-4.
- [10] PALMER, Jon, Steve FLINT, John BROOKS. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2007, 34(9), 577-588 [cit. 2021-11-24]. ISSN 1367-5435. Dostupné z:
<https://academic.oup.com/jimb/article/34/9/577/5993060?login=false>
- [11] HODZIC, Samir, Darko GOLIC, Jasmina SMAJIC, Selma SIJERCIC, Sekib UMIHANIC, Sefika UMIHANIC. Complications Related to Insertion and Use of Central Venous Catheters (CVC). *Medical Archives*. 2014, 68(5), 300-303 [cit. 2022-04-30]. ISSN 1986-5961. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4276017/pdf/MA-68-300.pdf>
- [12] POLDERMAN, Kees H., Armand R. GIRBES. Central venous catheter use. Part 2: infectious complications. *Intensive Care Medicine* [online]. 2002, 28(1), 18-28

- [cit. 2021-12-01]. ISSN 0342-4642. Dostupné z:
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00134-001-1156-7.pdf>
- [13] RAAD, Issam. Intravascular-catheter-related infections. *The Lancet* [online]. 1998, 351(9106), 893-898 [cit. 2022-04-30]. ISSN 01406736. Dostupné z:
[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(97\)10006-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(97)10006-X/fulltext)
- [14] PITTET, Didier, Sasi DHARAN, Sylvie TOUVENEAU, Valérie SAUVAN, Thomas V. PERNEGER. Bacterial Contamination of the Hands of Hospital Staff During Routine Patient Care. *Archives of Internal Medicine* [online]. 1999, 159(8), 821-826 [cit. 2022-04-30]. ISSN 0003-9926. Dostupné z:
<https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/485008>
- [15] WOLF, Hans-Heinrich, Malte LEITHÄUSER, Georg MASCHMEYER, Hans SALWENDER, Ulrike KLEIN, Iris CHABERNY, Florian WEISSINGER, Dieter BUCHHEIDT, Markus RUHNKE, Gerlinde EGERER, Oliver CORNELY, Gerd FÄTKENHEUER, Sabine MOUSSET. Central venous catheter-related infections in hematology and oncology. *Annals of Hematology* [online]. 2008, 87, 863-876 [cit. 2021-12-10]. ISSN 0939-5555. Dostupné z:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00277-008-0509-5>
- [16] GOLDMANN, Donald A., Gerald B. PIER. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1993, 6(2), 176-192 [cit. 2021-12-10]. ISSN 0893-8512. Dostupné z:
<https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/CMR.6.2.176>
- [17] OTTO, Michael. *Staphylococcus epidermidis*: a major player in bacterial sepsis? *Future Microbiology* [online]. 2017, 12(12), 1031-1033 [cit. 2021-12-07]. ISSN 1746-0913. Dostupné z:
<https://www.futuremedicine.com/doi/epub/10.2217/fmb-2017-0143>
- [18] BEEKMANN, Susan E., Daniel J. DIEKEMA a Gary V. DOERN. Determining the Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated From Blood Cultures. *Infection Control & Hospital Epidemiology* [online]. 2005, 26(6), 559-566

- [cit. 2022-05-10]. ISSN 0899-823X. Dostupné z: <https://scihub.se/10.1086/502584>
- [19] MERMEL, Leonard A., Michael ALLON, Emilio BOUZA, Donald E. CRAVEN, Patricia FLYNN, Naomi P. O'GRADY, Issam I. RAAD, Bart J. A. RIJNDERS, Robert J. SHERERTZ, David K. WARREN. Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2009, 49(1), 1-45 [cit. 2022-05-10]. ISSN 1537-6591. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article/49/1/1/369414?login=false>
- [20] WISPLINGHOFF, Hilmar, Harald SEIFERT, Richard P. WENZEL, Michael B. EDMOND. Current Trends in the Epidemiology of Nosocomial Bloodstream Infections in Patients with Hematological Malignancies and Solid Neoplasms in Hospitals in the United States. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2003, 36(9), 1103-1110 [cit. 2022-05-10]. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article/36/9/1103/311433?login=false>
- [21] NGUYEN, Thuan H., Matthew D. PARK, Michael OTTO. Host Response to *Staphylococcus epidermidis* Colonization and Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2017, 7 [cit. 2021-12-07]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00090/full>
- [22] GRICE, Elizabeth A., Heidi H. KONG, Sean CONLAN, Clayton B. DEMING, Joie DAVIS, Alice C. YOUNG, NISC Comparative Sequencing Program; Gerard G. BOUFFARD, Robert W. BLAKESLEY, Patrick R. MURRAY, Eric D. GREEN, Maria L. TURNER, Julia A. SEGRE. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science* [online]. 2009, 324(5931), 1190-1192 [cit. 2022-04-30]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1171700>
- [23] ROGERS, Kathie L., Paul D. FEY, Mark E. RUPP. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Infectious Disease Clinics of North America* [online]. 2009, 23(1), 73-98 [cit. 2022-04-30]. ISSN 08915520. Dostupné z: <https://daneshyari.com/article/preview/3404570.pdf>

- [24] KLEINSCHMIDT, Sharon, Flavia HUYGENS, Joan FAOAGALI, Irani U. RATHNAYAKE, Louise M. HAFNER. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. *Future Microbiology* [online]. 2015, 10(11), 1859-1879 [cit. 2022-04-30]. ISSN 1746-0913. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/283445907_Staphylococcus_epidermidis_as_a_cause_of_bacteremia
- [25] LEE, Ezra, Fatima ANJUM. *Staphylococcus epidermidis*. In: *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing, 2021 [cit. 2021-11-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563240/>
- [26] VOTAVA, Miroslav, Zdeněk BROUKAL a Jiří VANĚK. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře*. 1. vydání. Brno: Neptun, 2007. ISBN 978-80-86850-03-0.
- [27] <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteriaainphotos/bacteria%20under%20microscope/staphylococcus%20epidermidis%20microscopy.html#>
- [28] KWIECINSKI, Jakub M., Alexander R. HORSWILL. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2020, 53, 51-60 [cit. 2021-12-07]. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7244392/>
- [29] THOMER, Lena, Olaf SCHNEEWIND, Dominique MISSIAKAS. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* [online]. 2016, 11(1), 343-364 [cit. 2021-12-07]. ISSN 1553-4006. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5068359/pdf/nihms822093.pdf>
- [30] https://ebrary.net/67955/health/staphylococcus_aureus
- [31] JUNG, Philipp, Clara E. MISCHO, Gubesh GUNARATNAM, Christian SPENGLER, Sören L. BECKER, Bernhard HUBE, Karin JACOBS, Markus BISCHOFF. *Candida albicans* adhesion to central venous catheters: Impact of blood plasma-driven germ tube formation and pathogen-derived adhesins. *Virulence* [online]. 2020,

- 11(1), 1453-1465 [cit. 2021-12-09]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://cogentoa.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/21505594.2020.1836902>
- [32] CORREIA, Inês, Elvira ROMÁN, Daniel PRIETO, Susana HIDALGO-VICO, Rebeca ALONSO-MONGE, Jesús PLA. Role of *Candida albicans* mating in genetic variability and adaptation to the host. *Fungal Biology Reviews* [online]. 2019, 33(3-4), 180-189 [cit. 2022-08-11]. ISSN 17494613. Dostupné z: [Role of Candida albicans mating in genetic variability and adaptation to the host - ScienceDirect](#)
- [33] HUONG, Truong Thanh, Markéta KOMÍNKOVÁ, Roman GURÁŇ, Branislav RUTTKAY-NEDECKÝ, Pavel KOPEL, Libuše TRNKOVÁ, Ondřej ZÍTKA, Vojtěch ADAM, René KIZEK. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. 2014, 1, 64-66 [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: https://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/pdf/d-microbial_identification_by_maldi-tof_ms.pdf
- [34] ERB, Stefan, Reno FREI, Katharina SCHREGENBERGER, Marc DANGEL, Danica NOGARTH, Andreas F. WIDMER. Sonication for Diagnosis of Catheter-Related Infection Is Not Better Than Traditional Roll-Plate Culture: A Prospective Cohort Study With 975 Central Venous Catheters. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2014, 59(4), 541-544 [cit. 2022-07-12]. ISSN 1058-4838. Dostupné z: [Sonication for Diagnosis of Catheter-Related Infection Is Not Better Than Traditional Roll-Plate Culture: A Prospective Cohort Study With 975 Central Venous Catheters | Clinical Infectious Diseases | Oxford Academic \(oup.com\)](#)
- [35] SLOBBE, Lennert, Abdelilah EL BARZOUHI, Eric BOERSMA, Bart J. A. RIJNDERS. Comparison of the Roll Plate Method to the Sonication Method To Diagnose Catheter Colonization and Bacteremia in Patients with Long-Term Tunnelled Catheters: a Randomized Prospective Study. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2009, 47(4), 885-888 [cit. 2022-07-12]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: [Comparison of the Roll Plate Method to the Sonication Method To Diagnose Catheter Colonization and Bacteremia in Patients with Long-Term](#)

- [36] GUEMBE, María, Pablo MARTÍN-RABADÁN, Raquel CRUCES, María Jesús PÉREZ GRANDA, Emilio BOUZA. Sonicating multi-lumen sliced catheter tips after the roll-plate technique improves the detection of catheter colonization in adults. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2016, 122, 20-22 [cit. 2022-07-12]. ISSN 01677012. Dostupné z: [Sonicating multi-lumen sliced catheter tips after the roll-plate technique improves the detection of catheter colonization in adults - ScienceDirect](#)