

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Stanovení detekčních časů gram-negativních bakterií
v hemokultivačních přístrojích Bactec 9240 a BacT/Alert.**

**Možnosti využití těchto přístrojů pro kvantitativní
bakteriologická vyšetření.**



2006

Marcela Březáková

Děkuji MUDr. Pavlu Čermákovi, CSc. za vynikající vedení, trpělivost, poskytnuté rady a informace při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji Doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc. za odborný dozor v průběhu práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1. Historie	8
2.2. Definice sepse a dalších pojmů.....	9
2.2.1. SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome).....	9
2.2.2. Sepse.....	10
2.2.3. Těžká sepse.....	10
2.2.3.1. Septický šok.....	10
2.2.4. Syndrom multiorgánové dysfunkce (MODS-Multiple Organ Dysfunction Syndrome).....	10
2.2.5. Syndrom multiorgánového selhání (MOF-Multiorgan Failure).....	11
2.3. Původci sepse.....	11
2.4. Biochemické ukazatele infekce.....	12
2.4.1. Aktuálně zkoumané metody.....	12
2.5. Patofyziologie sepse.....	13
2.5.1. Imunitní (zánětlivá) odpověď.....	13
2.5.2. Koagulační odpověď.....	13
2.6. Klinický obraz sepse.....	14
2.7. Interakce mezi mikroorganismem a hostitelem.....	15
2.8. Sepse z centrálního žilního katétru.....	15
2.9. Diagnostika katéetrové sepse.....	15
2.9.1. Laboratorní diagnostika.....	15
2.9.2. Mikroskopické techniky.....	16
2.9.2.1. Acridin orange leukocyte cytospin (AOLC) test.....	16
2.9.3. Kultivace vzorků intravenózních katétrů.....	16
2.9.3.1. Semikvantitativní kultivace.....	16
2.9.3.2. Kvantitativní kultivace.....	17
2.9.3.2.1. Cleriho metoda.....	17
2.9.3.2.2. Brun-Buissonova metoda.....	17
2.9.3.2.3. Sonifikační metoda.....	17
2.9.3.2.4. Linarésova metoda.....	17
2.9.3.2.5. Intraluminální brush.....	18

2.9.4. Další diagnostické kultivační metody.....	18
2.9.4.1. Párové kultivace krve získané z intravenózního katétru a z periferní žíly.....	18
2.9.4.2. Kvantitativní kultivace vzorků krve z periferie a z katétru.....	18
2.9.4.3. Rozdílný čas positivity vzorků krve z periferie a z katétru.....	19
2.9.5. Klinická praxe.....	19
2.10. Preventivní opatření.....	20
2.11. Antibiotika v sepsi.....	21
2.12. Automatizované hemokultivační systémy.....	22
2.12.1. Vital.....	22
2.12.2. BacT/Alert.....	23
2.12.3. Bactec.....	27
2.12.4. Studie srovnávající hemokultivační systémy BacT/Alert a Bactec.....	30
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
3.1. Materiál.....	33
3.1.1. Biologický materiál.....	33
3.1.2. Pomůcky a přístroje	33
3.1.3. Roztoky a média.....	34
3.2. Metody.....	35
3.2.1. Měření detekčních časů u gram-negativních bakterií.....	35
3.2.2. Stanovení detekčních časů mikroorganismů přítomných na povrchu vyjmutých katétrů.....	36
3.2.3. Statistické vyhodnocení	36
4. VÝSLEDKY.....	38
4.1. Detekční časy aerobních gram-negativních bakterií.....	38
4.2. Detekční časy anaerobních gram-negativních bakterií.....	42
4.3. Detekční časy bakterií zachycených z povrchu vyjmutých katétrů.....	43
4.4. Statistické vyhodnocení.....	45
5. DISKUSE.....	46
6. ZÁVĚR.....	48
7. LITERATURA.....	49
PŘÍLOHA.....	55

TABULKY

Tabulka 1: Průměrný čas detekce (v hodinách) vybraných mikroorganismů kultivovaných v hemokultivačních systémech Bactec a BacT/Alert.....	31
Tabulka 2: Detekční časy bakterie <i>Escherichia coli</i> zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.....	39
Tabulka 3: Detekční časy bakterie <i>Klebsiella pneumoniae</i> zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.....	39
Tabulka 4: Detekční časy bakterie <i>Serratia marcescens</i> zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.....	40
Tabulka 5: Detekční časy bakterie <i>Citrobacter freundii</i> zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.....	40
Tabulka 6: Detekční časy bakterie <i>Proteus mirabilis</i> zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.....	40
Tabulka 7: Detekční časy bakterie <i>Pseudomonas stutzerii</i> zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.....	41
Tabulka 8: Detekční časy bakterie <i>Acinetobacter baumannii</i> zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.....	41
Tabulka 9: Detekční časy bakterie <i>Bacteroides fragilis</i> zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.....	42
Tabulka 10: TTD [h] mikrobů zachycených z povrchu katétrů a odpovídající počet CFU.....	44
Tabulka 11: Statistické vyhodnocení závislosti TTD na počtu inokulovaných CFU - lahvičky se sorbentem.....	45
Tabulka 12: Statistické vyhodnocení závislosti TTD na počtu inokulovaných CFU - lahvičky se sorbentem.....	45

OBRÁZKY

Obrázek 1: Rozdílná barva indikátorů hemokultivačních lahvíček systému BacT/Alert u pozitivního a negativního výsledku kultivace.....	24
Obrázek 2: Hemokultivační systém Bactec 9240.....	28
Obrázek 3: Hemokultivační lahvíčky systému Bactec.....	30

GRAFY

Graf 1: Závislost TTD [h] na množství inokulovaných CFU bakterie <i>E. coli</i> . Kultivace v lahvíčkách BacT/Alert FA a Bactec Plus Aerobic.....	54
Graf 2: Závislost TTD [h] na množství inokulovaných CFU bakterie <i>K. pneumoniae</i> . Kultivace v lahvíčkách BacT/Alert FA a Bactec Plus Aerobic....	54
Graf 3: Závislost TTD [h] na množství inokulovaných CFU bakterie <i>S. marcescens</i> . Kultivace v lahvíčkách BacT/Alert FA a Bactec Plus Aerobic....	55
Graf 4: Závislost TTD [h] na množství inokulovaných CFU bakterie <i>Citrobacter freundii</i> . Kultivace v lahvíčkách BacT/Alert FA a Bactec Plus Aerobic.....	55
Graf 5: Závislost TTD [h] na množství inokulovaných CFU bakterie <i>Proteus mirabilis</i> . Kultivace v lahvíčkách BacT/Alert SA a Bactec Standard Aerobic...	56
Graf 6: Závislost TTD [h] na množství inokulovaných CFU bakterie <i>Pseudomonas stutzerii</i> . Kultivace v lahvíčkách BacT/Alert FA a Bactec Plus Aerobic.	56
Graf 7: Závislost TTD [h] na množství inokulovaných CFU bakterie <i>Acinetobacter baumannii</i> . Kultivace v lahvíčkách BacT/Alert SA a Bactec Standard Aerobic.	57
Graf 8: Závislost TTD [h] na množství inokulovaných CFU bakterie <i>Bacteroides fragilis</i> . Kultivace v lahvíčkách BacT/Alert FAN a Bactec Lytic Anaerobic.	57

SEZNAM ZKRATEK

CRI (catheter related infection) – infekce související s katétrem

CRB (catheter related bacteriemia) – bakteriémie související s katétrem

CFU (colony forming unit) – kolonie tvořící jednotka

TTD (time to detection) – detekční čas

SIRS (systemic inflammatory response syndrome) – syndrom systémové zánětlivé odpovědi

MODS (multiple organ dysfunction syndrome) – syndrom multiorgánové dysfunkce

MOF (multiorgan failure) – syndrom multiorgánového selhání

JIP – jednotka intenzivní péče

IL – interleukin

TNF – tumor nekrotizující faktor

CRP - C-reaktivní protein

PCT – prokalcitonin

AOLC – acridin orange cytospin test

MRSA - meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

1. ÚVOD

Sepse se stala nejčastější a nejzávažnější komplikací v traumatologii a chirurgii. Její progrese do septického šoku či multiorgánového selhání je zdaleka nejčastější příčinou úmrtí na nekoronárních jednotkách intenzivní péče. Předstihla již i mortalitu na infarkt myokardu. V posledním půlstoletí chirurgové rozpoznali, že mimo již dávno známou nutnost odstranění zdroje infekce musí léčba zahrnovat i podávání antibiotik a orgánovou podporu. Vzdor velkým pokrokům v medicíně se stále mortalita při sepsi s jedním selhávajícím orgánem pohybuje mezi 20-30%, u dvou selhávajících orgánů dosahuje 30-40% a při 3 selhávajících orgánech již přesahuje 50% (Svoboda et al., 2004).

Incidence sepse se v posledních letech stále zvyšuje. Dokonce se dá říci, že všeobecné pokroky v medicíně zvyšují četnost septických stavů. Stále častější používání implantátů, provádění invazivních procedur, agresivní chemoterapie u nádorových onemocnění a imunosupresivní léčba po transplantacích i v jiných indikacích zvyšují riziko vzniku virulentních infekcí a sepse. Nezanedbatelný je i zvyšující se podíl starých lidí v populaci, u nichž je v případě závažného úrazu či operace riziko vzniku sepse vysoké.

Centrální žilní přístup je naprosto nevyhnutelnou součástí moderní medicíny a nemůže být ničím nahrazen. Na druhé straně, infekce související s katétrem (CRI – catheter related infection) jsou velmi častou nozokomiální infekcí a jsou významnou příčinou nemoci, úmrtnosti i zvýšených ekonomických nákladů. Ze všech cévních přístupů je z hlediska infekce zdaleka nejvýznamnější centrální žilní katétr, podstatně méně významné jsou periferní žilní přístupy a arteriální přístupy. Výskyt bakteriémie zapříčiněné katétrem se pohybuje mezi 3-14 pacienty na 1000 dní použití katétru a infekce vznikne u 5-10% zavedených katétru (Svoboda et al., 2004). Prokázané infekce však patrně tvoří jen pověstnou špičku ledovce a dokonce se předpokládá, že většina sepsí může mít vztah k zavedenému katéttru.

Cílem této práce bylo charakterizovat vztah detekčního času (TTD-time to detection) a množství infekčního agens (CFU-colony forming units) u patogenů nejčastěji se vyskytujících jako původci katérové sepse a posoudit

možnosti využití automatických hemokultivačních systémů Bactec a BacT/Alert pro kvantitativní stanovení mikroorganismů nacházejících se na povrchu cévních katétrů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. HISTORIE

V dnešní době spojujeme slovo sepse automaticky s mikroby. Vůbec si však přitom neuvědomujeme, že toto slovo předchází o dvě a půl tisíciletí začátkům porozumění mikrobiálnímu původu infekčních nemocí. Samotné slovo sepse pochází z řeckého „sepsios“, což lze přeložit jako shnilý, prohnílý a znamená rozklad – fenomén, který lidé kdysi považovali za mystický a nevyhnutelný přírodní proces.

Nejstarší známky léčby septických stavů jsou z doby 6000 až 4000 let před naším letopočtem, kdy byly zaživa prováděny trepanobiopsie lebky. Z některých kosterních pozůstatků lze předpokládat, že důvodem byl zánět mozkových blan. Infekční onemocnění byla největší metlou historie lidstva až do 20. století.

Pojem antiseptický použil poprvé hlavní chirurg britské armády John Pringle v roce 1752. Zavedením antiseptického postupu - umývání rukou chlorovým vápnem - do praxe Ignác Semmelweis takřka o 100 let později výrazně snížil výskyt horečky omladnic u svých pacientek ve Vídni. Louis Pasteur popsal v roce 1879, že zdrojem horečky omladnic je streptokoková infekce. V letech 1870-1900 byla objevena většina bakteriálních původců onemocnění, za řadou z těchto objevů stojí mikrobiolog Robert Koch. Aseptická chirurgie se datuje od roku 1885, kdy Bergmann a Schimmelbusch začali používat autokláv, v roce 1891 zavedl W. Halstead gumové chirurgické rukavice. Aseptický systém se pak dlouho zásadněji nezměnil až do objevu laminárního proudění na chirurgických sálech sirem Johnem Charleyem.

2.2. DEFINICE SEPSE A DALŠÍCH POJMŮ

Vzhledem k tomu, že pro různé stavy související se sepsí byla používána zejména v anglosaské literatuře a převzata do jiných řečí včetně odborné češtiny řada názvů, které měly mnohdy vyjadřovat totéž (např. seps, bakteriémie, septikémie, septický syndrom), navrhla konsensuální konference intenzivistů a plicních specialistů v Chicagu v roce 2001 nové definice a novou koncepci pro různá stadia rozvoje seps. Přestože se o definicích stále kriticky diskutuje, je možné konstatovat, že bez nich není v současné době možné publikovat žádnou významnější studii. SIRS, seps, těžká seps a MODS (MOF) reprezentují různá stadia jednoho patologického procesu. Ten začíná infekcí, která může v případě, že se s ní organismus nevyrovná, vést k systémové odpovědi – sepsi, jež může dále progredovat do těžké seps, septického šoku, orgánových selhání a případně skončit až smrtí.

2.2.1. SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome)

SIRS je uniformní syndrom systémové zánětlivé odpovědi organismu na různé noxy. Ty mohou mít původ zevní, kam patří faktory fyzikální (mechanické, tepelné, radiační), chemické (toxiny organického a anorganického původu), či biologické (bakterie, viry, houby, plísně) nebo vnitřní (tkáňové nekrózy, trombózy apod.). Přestože známky zánětu jsou popsány již více než 2000 let, stále chybí přesná definice zánětu. Didakticky se uvádí, že zánět je základním ustáleným typem reakce vyšších organismů, kterou se přizpůsobují poruše rovnováhy, vyvolanou zásahem různých škodlivin. I když později u mnoha z těchto stavů dojde k infekci, je nutné si uvědomit, že SIRS je zánětlivá reakce bez prokazatelné přítomnosti infekce v normálně sterilní tkáni hostitele. Zánětlivá reakce ke svému vzniku a průběhu infekci nepotřebuje. Pokud infekce překoná obranné bariéry organismu a je již prokazatelně přítomná, pojem SIRS se již použít nedá a jedná se pak o některé stadium seps. K diagnostice SIRS je nutná přítomnost alespoň dvou z následujících příznaků (A-D). Tyto změny musí být akutní změnou stavu a nesmí být projevem jiného onemocnění, které je známou příčinou těchto odchylek:

- A. Teplota nad 38°C nebo pod 36°C
- B. Tachykardie

- C. Tachypnoe
- D. Abnormální počet bílých krvinek

Definice SIRS patří k nejčastěji kritizovaným, protože jeho kritéria jsou podle většiny expertů příliš mírná a splní je prakticky každý pacient sledovaný na JIP či ARO. Mnozí autoři se však domnívají, že základní princip je správný a zpřísnění by bylo možné dosáhnout jednoduše nutností přítomnosti tří (místo dosavadních dvou) ze čtyř kritérií pro diagnózu SIRS (Černý et al., 2002).

2.2.2. Seps

Seps je definovaná jako specifický typ SIRS (tedy jsou splněna dvě či více výše zmíněných kritérií SIRS), při kterém je prokázána invaze patogenních nebo potenciálně patogenních mikroorganismů v normálně sterilní tkáni, tekutině nebo tělesné dutině hostitele. O sepsi se nejedná, pokud má pacient známky infekce, ale nesplňuje kritéria SIRS.

2.2.3. Těžká seps

Těžká seps je definována jako seps s orgánovou dysfunkcí a známkami hypoperfúze nebo sekundární hypotenze. Podle mnoha autorů je pro diagnózu těžké seps potřebná dysfunkce dvou a více orgánů, podle jiných stačí dysfunkce jednoho orgánu.

2.2.3.1. Septický šok

Septický šok je považován za součást těžké seps a vzniká její další progresí. Je definován jako těžká hypotenze, hypoperfúze a orgánová dysfunkce.

2.2.4. Syndrom multiorgánové dysfunkce (MODS-Multiple Organ Dysfunction Syndrome)

Dysfunkci dnes hodnotíme jako stav, při kterém činnost orgánu nebo orgánového systému není schopna zajistit homeostázu bez terapeutické intervence. Dalším rozvojem těžké seps může dojít k orgánové dysfunkci až selhání, které může postihnout kterýkoliv nebo všechny orgánové systémy. Typickým příkladem je selhání ledvin, jater, stresový vřed.

2.2.5. Syndrom multiorgánového selhání (MOF-Multiorgan Failure)

Jde o extrémní formu MODS. MOF však nemá všeobecně uznávaná diagnostická kritéria. Pro diagnózu víceorgánového selhání se dá použít např. Kokrovy klasifikace, spočívající v hodnocení 8 základních systémů (plicní, GIT, ledvinový, srdeční, jaterní, metabolický, hematologický a CNS) body 1 pro minimální, 2 pro střední a 3 pro těžké postižení. Jednotlivé bodové hodnoty jsou přesně definovány. MOF je posuzováno jako součet nejhorších skóre pro jednotlivé orgány (s vyloučením chronického postižení) a diagnostikováno, pokud součet přesáhne 8. Tento systém ale nebyl obecněji přijat (Svoboda et al., 2004). MOF nepatří do termínů stanovených konsensuální konferencí, ale je stále všeobecně používán, protože nejlépe vyjadřuje tento nejzávažnější klinický stav často vedoucí ke smrti nemocného.

2.3. PŮVODCI SEPSE

Příčinou sepse mohou být jak gram-negativní, tak gram-positivní bakterie, houby, viry, spirochety i prvoci.

Gram-negativní bakterie způsobovaly většinu infekcí krevního oběhu do let osmdesátých, kdy začal narůstat podíl gram-positivních bakterií. Uvedený zvyšující se podíl nárůstu gram-positivních infekcí, které se staly téměř stejně časté jako infekce gram-negativní, je dokumentován v řadě studií. Na jejich základě lze shrnout, že v současnosti jsou gram-positivní bakteriémie přítomny u 34% a gram-negativní u 42% infekcí. Smíšená bakteriální infekce se objevuje u 14% pacientů. Polovina gram-positivních infekcí je způsobena stafylokoky (*S.aureus* 12% , *S. koaguláza-negativní* 7%). Enterokoky byly izolovány v 8% a pneumokoky ve 4% případů. Nejvíce gram-negativních infekcí působí enterobakterie (29%), z nichž nejčastější jsou *Escherichia coli* (13%) a *Klebsiella pneumoniae* (8%). Třetí nejčastější gram-negativní bakterií při sepsi je *Pseudomonas aeruginosa* (8%). Kvasinky, hl. *Candida sp.*, byly izolovány u 5% pacientů v sepsi a počet kvasinkových infekcí jednoznačně narůstá. Anaeroby byly izolovány jen u 2% pacientů v sepsi (Vacek, 1994; Svoboda et al., 2004; Ševčík, 1997).

2.4. BIOCHEMICKÉ UKAZATELE INFEKCE

Ve snaze časně identifikovat rozvoj infekce bylo sledováno množství ukazatelů, které jsou nedílnou součástí systémové zánětlivé reakce. V průběhu sepse lze nalézt zvýšené koncentrace cytokinů (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10), nicméně k jejich zvýšení dochází i v průběhu nebakteriálních infekcí (např. u malárie) a u řady neinfekčních stavů (popáleniny, traumata, pankreatitis, srdeční selhání,...). V interpretaci hladin cytokinů je rovněž nutno mít na zřeteli řadu faktorů, mimo jiné i přítomnost inhibitorů a antagonistů jednotlivých mediátorů, které svým účinkem významně modulují výslednou reakci organismu (Bednář et al., 1996). Sledování hladin cytokinů v rutinní praxi není doporučeno.

V poslední době přibývá prací zabývajících se sledováním C- reaktivního proteinu (CRP) a prokalcitoninu (PCT) v odlišení stavů, které se mohou klinicky manifestovat jako seps. Přestože CRP i PCT patří k tzv. proteinům akutní fáze, jejich úloha v patogenezi sepse není zcela objasněna. Zvýšené hladiny CRP byly nalezeny u bakteriálních infekcí, nicméně řada dalších prací prokazuje vzestup CRP i u neinfekčních stavů, jakými jsou např. angina pectoris, traumata, pooperační stavy. Zvýšené hladiny PCT byly nalezeny u nemocných s generalizovanými známkami bakteriální infekce v porovnání s pacienty s virovou infekcí. Další práce prokazují zvýšené hladiny PCT jako poměrně spolehlivý ukazatel rozvoje sepse a orgánové dysfunkce u nemocných s traumaty. Byla nalezena vyšší senzitivita a specifita CRP v diagnostice infekce v porovnání s PCT. Specifita výrazně stoupá při kombinaci obou parametrů. Uvedené ukazatele ale nemohou spolehlivě odlišit sepsi od jiných příčin zánětlivé reakce. Jejich sledování v čase je významnější než izolované hodnoty (Ševčík, 1997; Černý et al,2004).

2.4.1. Aktuálně zkoumané metody

- 1.Polymerase chain reaction (PCR)
- 2.Nukleozomy
- 3.Hyposfosfatémie
- 4.HLA-DR (povrchový antigen monocytů)
- 5.Polymorfonukleární elastáza

6. Neopterin

7. Fosfolipáza A2

8. Endotoxin

9. Selectin

2.5. PATOFYZIOLOGIE SEPSE

Dnes je prokázáno, že zásadní roli v rozvoji těžké sepse hrají faktory imunitní (zánětlivé) a hemokoagulační odpovědi organismu na infekci.

2.5.1. Imunitní (zánětlivá) odpověď

Původní zánětlivá odpověď na mikrobiální invazi je užitečná, mobilizuje obranu proti infekci a umožňuje hojení ran. Pokud však kontrolní mechanismy, které omezují odpověď organismu, jsou nedostačující nebo je jejich kapacita překročena závažností infekce, odpověď organismu může být nadměrná, produkce mediátorů se vymkne kontrole, vzniká sepse, která se může prohloubit do těžké sepse, septického šoku a pacient může zemřít. Pro přežití pacientů je z imunitního hlediska rozhodující rovnováha mezi pro a protizánětlivou reakcí (Holub, 1998).

2.5.2. Koagulační odpověď

Regulační mechanismy, které zabraňují tomu, aby se koagulace u zdravých osob generalizovala, jsou tři: inhibitor tkáňového faktoru, aktivovaný protein C a antitrombin III.

V průběhu sepse dochází k aktivaci koagulace. V časných fázích sepse je zvýšena koncentrace několika koagulačních faktorů, především fibrinogenu, faktoru II, V, VII, VIII, IX, X, v rámci akutní reakce. Produkce koagulačních faktorů převyšuje aktuální potřebu. Mikrotromby se pak šíří do vzdálených orgánů, vyvolávají jejich dysfunkci až selhání a jsou v hlavní míře odpovědné za MODS či multiorgánové selhání (MOF).

2.6. KLINICKÝ OBRAZ SEPSE

V časně fázi sepse mohou být klinické příznaky zcela nespecifické. Téměř všechny symptomy kardiální, zažívací, respirační, urinární či kožní, ale také změny chování mohou být první manifestací sepse. V typických případech bývá hyperdynamický stav cirkulace s tachykardií, mírnou hypotenzí, dobrým prokrvením periferie, tachypnoí a za předpokladu adekvátní hydratace i se zvýšenou diurézou. Pravidlem je remitentní nebo nepravidelná horečka, třesavka, pocit mrazení, psychické změny, septický tumor sleziny, leukocytóza s posunem doleva. Ne vždy bývá zřejmé ložisko sepse. V dalším průběhu dominuje sled cirkulačních, respiračních a metabolických změn až k výskytu septického šoku.

Řada sepsí bývá spojena s různě výrazným exantémem. Velké kožní změny u sepsí sice mohou být určitým vodítkem, ale nikdy nejsou pro určitý druh mikroorganismu specifické.

Sepse u novorozence má chudou symptomatologii. Teplota může být zvýšená, ale často bývá hypotermie, dítě je hypotonické, odmítá pít, může zvracet, mít průjem, urychleně a namáhavě dýchat, může být dráždivé se sklonem ke křečím, ale žádný z těchto příznaků není pro sepsi jednoznačně specifický.

Sepse u lidí vysokého věku bývá rovněž chudá na příznaky. Teplota může být jen mírně zvýšená a náhlý nástup zmatenosti s tachypnoí jsou někdy jedinými projevy.

S diagnostickými potížemi se setkáváme také u pacientů s těžkým základním onemocněním, u popálených, u závažných pooperačních stavů, u bezvědomých. Nejcitlivějším ukazatelem nastupující sepse je zde náhlý vznik hyperventilace a u nemocných při vědomí nástup předrážděnosti a zmatenosti.

Nález jen zcela minimálních příznaků v počátečních stádiích sepse výrazně ztěžuje včasnou diagnózu infekce. Včasná diagnostika sepse a identifikace zdroje infekce jsou základními a nezastupitelnými předpoklady zahájení účinné terapie s cílem zabránit vzniku progresivního stavu, rozvoji orgánové dysfunkce a smrti (Beneš, 1996).

2.7. INTERAKCE MEZI MIKROORGANISMEM A HOSTITELEM

Zdroje sepse se ve vztahu ke krevnímu řečišti rozdělují na:

- intravaskulární – endokarditidy, infekce žil, tepen, arteriovenózních vstupů
- extravaskulární – rány, furunkly, invazivní zákroky, abscesy, záněty tělových dutin.

2.8. SEPSE Z CENTRÁLNÍHO ŽILNÍHO KATÉTRU

Zdrojem nejčastějších patogenů je kožní flóra: za 2/3 CRI (catheter-related infection) jsou zodpovědné G⁺ koky. Nejběžnějšími patogeny jsou kmeny stafylokoků a kandidy. G⁻ bakterie jsou méně časté. Největší patogenní význam mají asi zlatý stafylokok a *Pseudomonas aeruginosa*. Přibývá ovšem i infekcí MRSA (metilicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*) a kandidami (Černý et al., 2002; Svoboda et al., 2004).

Existují čtyři potenciální zdroje kolonizace katétru a katérové sepse: kůže v místě vpichu, katérový rozbočovač – hub, hematogenní rozsev infekce a kontaminace infúze. Do katérového rozbočovače mohou být mikroorganismy zaneseny z rukou zdravotnického personálu. Zavlčení bakterií ze vzdáleného místa (dýchacích cest, gastrointestinálního traktu nebo močových cest) může být také příčinou katérové infekce. Hematogenní kolonizace a infekce katétru je ale vzácná.

Kolonizace katétru může nastat v zásadě dvěma cestami: extraluminózní a intraluminózní. Infikování kožním vstupem je typické pro katétry používané krátkodobě do 2-3 týdnů, zatímco infekce lumenem je častější u dlouhodobě užívaných katétrů. Zdrojem infekce jsou v obou případech nejčastěji komenzálové z vlastní kůže pacienta. Nebezpečí je ovšem v tom, že patogenní nemocniční kmeny v mnoha případech mezitím již nahradily normální kožní flóru pacienta.

2.9. DIAGNOSTIKA KATÉROVÉ SEPSE

2.9.1. Laboratorní diagnostika

Laboratorní diagnostika infekcí spojených s katetrizací spočívá v průkazu přítomnosti bakterií na distálním konci katétrů zasahujícím

do lumina cévy. Většinou jsou založeny na přímém vyšetření vzorku katétru po jeho odstranění z těla pacienta.

2.9.2. Mikroskopické techniky

Nejvíce se používají dvě techniky, barvení podle Grama a akridin fluorescenční barvení. Lze barvit katétr nebo nezředěnou a necentrifugovanou krev odebranou z katétru. Někteří autoři uvádí dobrou korelaci mezi těmito technikami a kultivací. Řada dalších tyto závěry ale nepotvrdila, uvádí nižší senzitivitu těchto metod a argumentují tím, že nejsou použitelné na všechny typy katétrů (Cooper a Hopkins, 1985; Kite et al., 1999).

2.9.2.1. Acridin orange leukocyte cyospin test (AOLC)

Po cytocentrifugaci se provádí barvení buněk acridinovou oranží. Vyžaduje jen zcela nepatrné množství krve (0,05 ml) odebrané z lumen centrálního katétru. Vyšetření je pro laboratoř velmi jednoduché a výsledek je k dispozici za 30 minut.

2.9.3. Kultivace vzorků intravenózních katétrů

Nejspolehlivějšími diagnostickými metodami jsou semikvantitativní (metoda rolování) a kvantitativní (třepání nebo sonifikace) techniky katéetrové kultivace. V porovnání s kvalitativními kultivačními metodami jsou velmi specifické. Kvalitativní kultivace nejsou považovány za vhodné, protože každá kontaminace může být považována za pozitivní výsledek (Brun Buisson et al., 1987; Cleri et al., 1980).

2.9.3.1. Semikvantitativní kultivace

Maki popsal jako první metodu mikrobiologické diagnostiky katéetrové infekce. Jeho metoda spočívá v rolování segmentu katétru po povrchu agarové pŕdy. Hraniční hodnotou určující infekci katétru bylo stanoveno 15 CFU (colony forming units). Metoda je nenáročná na technické vybavení, není pracná a lze ji provést v jakékoliv laboratoři s minimálními náklady (Maki et al., 1977). Nicméně je tato metoda omezena tím, že je možné odebrat vzorky mikroorganismů pouze z vnějšího povrchu a nemůžeme získat

organismy, které se nacházejí ve vrstvě biofilmu uvnitř katétru (Mermel et al., 1991).

2.9.3.2. Kvantitativní kultivace

U dlouhodobě zavedených katétrů je častější endoluminální kolonizace než periluminální. Bylo popsáno několik metod, které detekují bakterie přítomné i na vnitřním povrchu katétru.

2.9.3.2.1. Cleriho metoda

Cleri použil postupné vyplachování katérového lumen kultivačním bujónem. Hraniční hodnotu indikující vznik katérové infekce stanovil na 1000 CFU/ml (Cleri et al., 1980).

2.9.3.2.2. Brun-Buissonova metoda

Metoda spočívá ve vložení segmentu katétru do zkumavky s 1 ml sterilní destilované vody, důkladném protřepání a následné kvantitativní kultivaci takto připravené suspenze. Hraniční hodnotou je zde 100 CFU/ml (Brun-Buisson et al., 1987). Tato metoda prokázala senzitivitu 97,5% a specifitu 88% pro diagnózu katérové infekce a 100% senzitivitu a specifitu pro diagnózu katérové bakteriémie.

2.9.3.2.3. Sonifikační metoda

Tato metoda spočívá v sonifikaci segmentu katétru ponořeného do 10 ml kultivačního bujónu a následné kvantitativní kultivaci bujónu. Je náročnější na provedení a technické vybavení (Sheretz et al., 1990).

Vytřepávací a sonifikační metody jsou citlivější o 20% oproti metodě rolovací (Sheretz et al., 1997). Doposud popsané kvantitativní metody ale nestanovují, zda je infekce endoluminálního nebo exoluminálního původu. Tento problém řeší Linarésova metoda.

2.9.3.2.4. Linarésova metoda

V roce 1985 Linarés popsal metodu, která je modifikací Cleriho kvantitativní metody. Propláchnul vnitřní povrch katétru 2 ml kultivačního média, které potom mnohonásobně zředil a stanovil endoluminální kolonizaci

katétru. Následně byl katétr kultivován metodou podle Makiho (rolovací technika) k určení exoluminální kolonizace (Linarés et al., 1985). Tato poměrně pracná metoda má senzitivitu 100% a je zajímavá hlavně z hlediska patofyziologie katéetrových infekcí (Cleri et al., 1980; Sadoyama et al., 2003).

2.9.3.2.5. Intraluminální brush

Tuto techniku lze popsat jako vsunutí kovového vodiče středem katétru až na jeho konec. Na konci vodiče je připojený polyamidový kartáč, který je po použití kultivován rolováním po agarové pěstě. Velkou výhodou této techniky je, že umožňuje odběr vzorků na kultivaci bez nutnosti vytažení katétru. Nicméně vsunutím polyamidového kartáče až na konec katétru může dojít k rozšíření bakterií do krevního oběhu a následně k vzniku sekundární bakteriémie. Tato metoda může vést v 6% případů k vážným komplikacím (Tighe et al., 1996).

2.9.4. Další diagnostické kultivační metody

2.9.4.1. Párové kultivace krve získané z intravenózního katétru a z periferní žíly

Pacientovi s podezřením na katéetrovou infekci se odeberou 2 sady hemokultur – z katétru a punkcí z periferní žíly. Pozitivní výsledek hemokultury získané z katétru vyžaduje klinickou interpretaci, zatímco negativní výsledek je nápomocný pro vyloučení infekce krevního řečiště související s katetrizací (Fan et al., 1989).

2.9.4.2. Kvantitativní kultivace vzorků krve z periferie a z katétru

Kvantitativní hemokultivační techniky byly vyvinuty jako alternativa pro diagnózu katéetrové infekce krevního řečiště u pacientů, pro které je odstranění katétru nežádoucí z důvodu ztráty cévního přístupu. Tato metoda spočívá v kvantitativní kultivaci párových krevních vzorků. Jeden z těchto vzorků je získán přes hrdlo katétru, druhý punkcí periferní žíly. Ve většině studií je uváděno, že o katéetrové infekci krevního řečiště můžeme usuzovat tehdy, pokud krev získaná z katétru vykazovala po kultivaci alespoň

5 – 10 krát více kolonií než krev z periferní žíly (Capdevilla et al., 1992; Blot et al., 1998).

2.9.4.3. Rozdílný čas positivity vzorků krve z periferie a z katétru

Tato metoda je velmi dobře srovnatelná s kvantitativními hemokultivacemi. Využívá monitorování positivity krevní kultivace automatickými hemokultivačními systémy a porovnává rozdílný čas positivity vzorku krve získaného z katétru a z periferní žíly. Pokud je detekce positivity u krve z katétru o více jak 2 hodiny kratší než u krve z periferní žíly, jedná se o katérovou infekci. Přesnost metody je srovnatelná s kvantitativní kultivací krevních vzorků a jeví se také jako ekonomicky výhodnější (Blot et al., 1999; Crnich a Maki, 2001).

2.9.5. Klinická praxe

Běžnou praxí je, že v případě podezření na CRI je katétr vytažen. Následné bakteriologické vyšetření špičky katétru však prokáže infekci jen v 15-25% případů, a to dokonce i v případě lokálního zarudnutí v místě jeho vstupu (Ševčík, 1997). Z tohoto pohledu je tedy velká většina cévek odstraněna zbytečně. Ve většině případů je nutné zavést nový katétr se všemi riziky s tím spojenými.

Prokázaná infekce nemusí být zdrojem sepse, může dojít ke kontaminaci o kůži při vytahování katétru, a naopak ani infekce vyvolaná katétrelem nemusí být prokázána

Existuje řada faktorů, které jsou spojeny s vyšším rizikem CRB=bakteriémie související s katétrelem (catheter-related bacteriemia):

- místo zavedení katétru: podklíčková žíla je spojena s nižším výskytem kolonizace a infekce katétru než jugulární či femorální žíla. Riziko infekce je větší tam, kde je koncentrovanější kožní flóra, a nezávisí na druhu čištění kůže.
- obtížnost zavedení katétru: obtížné zavádění katétru a opakované pokusy jsou spojeny s vyšším výskytem infekce.
- počet lumen katétru: víceluminální katétrů mohou být spojeny s vyšším rizikem infekce v porovnání s jednoluminálními katétrů (nejspíše z důvodu častější manipulace s katétrelem).

- účel katétru: použití centrálního žilního katétru pro parenterální výživu je spojeno s vyšším výskytem kolonizace.
- doba zavedení katétru: riziko spojené se zavedením centrálního žilního katétru stoupá při době zavedení delší než jeden týden.
- předchozí katétrů: výměna katétru po vodiči může být spojena s vyšším výskytem infekce v porovnání se zavedením katétru v jiném místě.
- průvodní onemocnění: traumata a popáleniny jsou spojeny s vyšším rizikem.

2.10. PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ

Při jakékoli manipulaci s katétrů je doporučováno používání většího množství ochranných prostředků jako jsou: sterilní rukavice, roušky, masky, pláště a čepice. Samozřejmě je pečlivé umytí rukou. Důležité je také použití antimikrobních a antiseptických kožních přípravků.

Riziko infekce je možné snížit použitím tunelovaných katétrů (po určitou vzdálenost od vstupu do žíly je katétr veden pod kůží). U vysoce rizikových pacientů (s rozsáhlými popáleninami apod.) je nutné zvážit použití nově vyvinutých katétrů z antiadhezivních biomateriálů, katétrů povlečených antibiotikem nebo obsahujících ionty stříbra. Stříbrné ionty slouží jako antimikrobní prostředek a fyzická bariéra migrace bakterií. Katétrů s ionty stříbra jsou schopny snížit riziko CRI o polovinu až o 70%, ale tato výhoda se patrně ztrácí, pokud jsou použity pro výživu (Svoboda et al., 2004). Toto protiinfekční opatření má ale krátkodobý účinek, protože kolagen, v kterém jsou stříbrné ionty vázány, je postupně biodegradován. Proto nemůže být potah ze stříbrných iontů použit u dlouhodobě zavedených centrálních venózních katétrů, je vhodný pouze pro ty, u kterých se doba zavedení pohybuje v rozmezí 5 až 9 dnů.

Podobných výsledků bylo dosaženo s katétrů potaženými zevně kombinací chlorhexidinu a sulfadiazinu stříbra. Ve srovnání s nimi však ještě podstatně účinnější byly katétrů impregnované (zevně i vnitřně) dvěma antibiotiky – minocyklinem a rifampicinem. Tato kombinace poskytuje široké spektrum inhibice gram-pozitivních a gram-negativních bakterií a je účinná i proti *Candida albicans*. Současné směrnice říkají, že katétrů s antimikrobiálním povlakem se mají použít u pacientů s vysokým rizikem CRI

(imunokompromitovaní nebo kde je katétr mimo jiné účely určen pro parenterální výživu) a u pacientů, kteří jej budou potřebovat déle než 4 dny (Černý et al., 2002).

Lze také použít katétr s antiseptickým vnitřním povrchem. Jejich jedinou nevýhodou je, že chrání pouze proti vnitřní kolonizaci katétru, tedy proti migraci mikroorganismů středem katétru podél jeho vnitřního povrchu. Nijak tedy neomezují vznik infekcí způsobených kožními mikroorganismy, které migrují po zevním povrchu katétru.

Perspektivně lze očekávat vývoj polymerů povlečených antiadhezivními molekulami nebo zabudováním látek blokujiících expresi genů nejčastějších patogenů do lumina katétrů.

2.11. ANTIBIOTIKA V SEPSI

Léčba pacientů v sepsi, těžké sepsi nebo v septickém šoku vyžaduje komplexní přístup, jehož základní součástí musí být vždy snaha o účinnou kontrolu zdroje infekce. Stěžejním bodem léčby je antimikrobiální terapie spolu s postupy chirurgické kontroly zdrojů infekce.

Antimikrobiální léčba musí být v případech těžké sepse či septického šoku zahájena ihned, současně s odstraněním katétru. Pokud se musí volit antibiotikum naslepo, závisí výběr zejména na místní nozokomiální flóře a její rezistenci na antibiotika. Obecně je doporučovaná dvojkombinace např. vankomycinu s aminoglykosidem, i když jiní autoři zase doporučují šetřit vankomycin pro infekce způsobené MRSA (Beneš, 1996). Jinou možností je monoterapie carbapenemem, kde přidání aminoglykosidu celkový účinek nezlepší, naopak vyvolá u takřka poloviny pacientů známky selhávání ledvin. U pacientů s poruchou imunity nebo v závažném stavu je vhodné zahájit empiricky léčbu cefalosporinem III. nebo IV. generace se záměrem pokrýt střevní G⁻ bakterie a pseudomonády (Černý et al., 2002). Třetí nejčastější CRI je způsobena kandidami, které jsou zodpovědné za 20% případů CRI a mají ze všech katéetrových infekcí nejvyšší mortalitu. Pokud byla již dříve kultivována *Candida sp.* nebo je pacient vysoce rizikový, je vhodné přidat naslepo i antimykotickou léčbu např. flukonazolem. Léčba musí být co nejdříve upravena a zúžena podle výsledku kultivace špičky katétru a hemokultur.

U vysoce rizikových infekcí (zlatý stafylokok, pseudomonády, kandidy) je třeba, aby antimikrobiální léčba i v nekomplikovaných případech (ústup známek sepse a bakteriémie do 3 dnů) trvala nejméně 14 dní. Pokud fungémie či bakteriémie přetrvává, je nutné prodloužit léčbu antibiotiky na 4-6 týdnů. U ostatních mikrobů stačí, aby léčba trvala 5-7 dní za předpokladu, že infikovaný katétr byl odstraněn. Pokud je znám vyvolávající mikroorganismus a jeho citlivost na antibiotika, a současně je klinický stav pacienta stabilizovaný, je možné přejít na perorální antibiotika s vynikající biologickou dostupností a vysokým průnikem do tkání jako je Biseptol nebo ciprofloxacin (Svoboda et al., 2004).

Novou léčebnou strategií posledních let, která může zabránit výměně řady katétrů a o kterou je nutné se pokusit ve vhodných případech (nejsou známky těžké sepse, resp. je velmi vysoké riziko nové kanylace), je použití techniky antibiotického zámku. Technika spočívá v tom, že roztokem antibiotika se naplní lumen katétru a ponechá se působit hodinu či více hodin. Antibiotikum je v katétru ve farmakologické koncentraci a tímto způsobem je možné zachránit výrazně více katétrů než při samotné parenterální aplikaci antibiotika (Černý et al., 2002).

2.12. AUTOMATIZOVANÉ HEMOKULTIVAČNÍ SYSTÉMY

Automatizované systémy u každé pozitivní hemokultury uvádí hodnotu TTD (time to detection). TTD = doba (v hodinách) od vložení nádoby do přístroje do vyhodnocení positivity. TTD závisí na druhu mikroorganismu a na jeho množství v odebrané krvi (Bryanth a Thorpe, 1995; Motr et al., 1995). U nádobek inokulovaných vysokou koncentrací CFU je detekce rychlejší než u nádobek s nízkou koncentrací mikroba. Hodnota TTD tedy může poukázat na množství mikroorganismů ve vzorku, ale nelze ji použít k přesnému určení etiologického agens.

2.12.1. Vital

Tento systém je prezentován firmou bioMérieux jako první automatický přístroj pro hemokultury pracující na principu H.F.T. (Homogeneous Fluorescence Technology).

Všechny mikroorganismy při svém růstu produkují CO₂. Tím způsobují změnu pH a redox potenciálu média. Tyto změny nastávají bez ohledu na druh metabolického procesu.

Součástí kultivačního média jsou přirozeně fluoreskující molekuly, které vykazují při uvedených biologických jevech pokles fluorescence a detekují tak přítomnost mikroorganismů.

Mikroorganismy produkující jen malé množství CO₂ (*Brucella sp.*, *Acinetobacter sp.*), jsou rychle a přesně detekovány spolu se změnou pH a redox potenciálu.

Přístroj Vital automaticky registruje fluorescenci v každé kultivační nádobce (každých 15 minut). Čtecí systém využívá k přenosu emitované fluorescence optická vlákna.

Kultivační nádoby obsahují účinné širokospektré médium na bázi sojového kaseinového hydrolyzátu. V médiu jsou obsaženy také inhibitory činnosti antibiotik a působků krve. Nádoby jsou ve dvojím provedení:

-Vital aer - pro aerobní kultury, obsahuje specifickou atmosféru – směs O₂ a CO₂.

-Vital ana - pro anaerobní kultury, obsahuje směs CO₂ a N₂.

Nádoby se injikují 10 ml krve. K růstu a detekci mikroorganismů přispívá souvislé protřepávání (reklamní materiál firmy bioMérieux, 1996).

V současné době již firma bioMérieux ukončila výrobu a distribuci tohoto hemokultivačního systému. Přešla výhradně na distribuci systému BacT/Alert.

2.12.2. BacT/Alert

Hemokultivační systém BacT/Alert (Organon Teknika Corp., Durham, N.C., USA) byl poprvé představen v roce 1990.

BacT/Alert je plně automatický hemokultivační systém zahrnující vlastní přístroj ovládaný počítačem a kultivační nádoby. Umožňuje současně inkubaci, protřepávání a kontinuální monitorování vzorků pacientů. Systém poskytuje kvalitativní vyšetření a záchyt aerobních a anaerobních mikroorganismů (bakterií a hub) z krve všude tam, kde je předpoklad velkého zředění a obtížného záchytu.

Za přítomnosti a při následném množení mikroorganismů je metabolizován substrát kultivačního média. Rostoucí mikroby produkují CO₂, který způsobuje změnu barvy indikátoru přítomného v každé kultivační nádobce. Tento proces je kontinuálně a neinvazivně monitorován v každé cele. Přístrojem je detekována i nepatrná změna barvy indikátoru.

Komplex algoritmů využívá tři principy detekce: rozlišuje akceleraci CO₂ produkovaného mikroorganismy, hodnotí vysoký stupeň změny produkce CO₂ v závislosti na čase a detekuje počáteční úroveň CO₂. Pozitivita nebo negativita vzorků je určována pomocí rozhodovacího programu.

Jednotlivé vzorky jsou automaticky monitorovány a vyhodnocovány každých 10 minut. Výsledky detekce jsou signalizovány písemně, zvukově a světelně.

Pro každou nádobku je vyhodnocen tvar růstové křivky tvorby CO₂ na čase. Inkubace probíhá při 35-37°C. Každý vzorek je identifikován čárovým kódem umístěným na firemním štítku nádobek.



Obrázek 1: Rozdílná barva indikátorů hemokultivačních lahviček systému BacT/Alert u pozitivního a negativního výsledku kultivace.

Hemokultivační nádoby:

Standardní aerobní nádoby (standard aerobic)

Nádoby obsahují pankreaticko natrávený kasein, papainem natrávený sojový substrát, SPS, pyridoxin chlorid a další komplexní substrát obsahující aminokyseliny a cukry v purifikované vodě (celkový objem 40ml).

Po inokulaci 5 -10 ml krve, před zahájením inkubace, je velmi důležité odvzdušnit nádoby sterilní jehlou. Odvzdušněním vnikne atmosférický kyslík do nádobek a nahradí v nich přítomné vakuum, čímž je podpořen růst aerobních mikroorganismů.

Standardní anaerobní nádoby (standard anaerobic)

Nádoby obsahují pankreaticko natrávený kasein, papainem natrávený sojový substrát, SPS, menadion, hemin, redukující činidla a další komplexní substrát obsahující aminokyseliny a cukry v purifikované vodě (celkový objem 40ml). Po inokulaci 5 – 10 ml krve se nádoby nesmějí odvzdušňovat (Scharfen, 1995).

Pediatrické nádoby (Pedi-BacT/Alert)

Malý objem je ideální pro použití v pediatrii nebo pro pacienty v těžkém stavu. Médium obsahuje 20 ml mozko – srdcové infuze (brain – heart infusion) s heminem, menadionem a pyridoxinem. Jako antikoagulans je použit 0,02% SPS. Atmosféru tvoří směs CO₂ s dusíkem. Dle doporučení výrobce se odebírá minimálně 0,5 ml krve, maximálně však 4 ml krve. 90% těchto nádobek je (dle firemních údajů) pozitivních do 24 hodin.

Nádoby typu FAN (fastidious antimicrobial neutralizing)

Složení kultivačního média dochází k minimalizaci efektu toxických elementů z krve a zároveň jsou regenerovány choulostivé mikroby. Nádoby obsahují Ecosorb – patentovanou vyváženou směs aktivního uhlí a obohaceného kultivačního média. Nádoby typu FAN jsou citlivější než nádoby typu STD – standard aerobic a standard anaerobic (Frank et al., 1999).

Nádobky FAN aerobic a FAN anaerobic

Tyto nádobky jsou v provedení pro aerobní a anaerobní použití. Aerobní nádobky slouží ke kultivaci mikrobů vyžadujících nebo tolerujících při růstu kyslík. Anaerobní nádobky mají speciálně upravenou atmosféru, aby mohly růst i mikroorganismy neschopné existence v prostředí s O₂ (většina klinicky důležitých mikrobů).

Nádobky obsahují 40 ml mozko-srdcové infuze s Ecosorbem. Jako antikoagulans je použit 0,05% SPS. Atmosféru v aerobním systému tvoří směs CO₂ se vzduchem a v anaerobních nádobkách směs CO₂ s dusíkem. Dle doporučení výrobce se odebírá 5 – 10 ml krve.

Jako materiál lze použít nejen krev, ale i likvor, pleurální tekutinu, punktáty kloubů, bronchoalveolární laváže, oplachy katetrů ve fyziologickém roztoku i stěry z kůže v místě vpichu.

Nádobky BacT/Alert FA

Používají se k získání a detekci aerobních mikroorganismů ve vzorcích krve a jiných, normálně sterilních tělních tekutin odebraných pacientům podezřelých z bakteriémie/fungémie.

Obsahují 30 ml média o složení: aktivní uhlí, sojový extrakt natrávený trypsinem, mozko-srdcovou infuzi, SPS, pyridoxin chlorid, menadion, hemin, L-cystein a další komplex aminokyselin a karbohydrátových substrátů v purifikované vodě. Nádobky jsou připraveny pod vakuem v atmosféře kyslíku.

Nové FA médium ve srovnání s FAN médiem je kvalitnější v zachytu kvasinek (zejména *Candida albicans*), *Cryptococcus neoformans* a *Burkholderia cepacia*. Pro ostatní klinicky významné mikroorganismy jsou srovnatelné (Mirrett, 2001).

Nádobky BacT/Alert FN

Používají se k získání a detekci anaerobních mikroorganismů ve vzorcích krve a jiných, normálně sterilních tělních tekutin odebraných pacientům podezřelých ze septikémie.

Obsahují 40 ml kultivačního média o stejném složení jako nádobky typu FA. Nádobky jsou připraveny pod vakuem v atmosféře dusíku.

Nádobky BacT/Alert SN

Používají se k získání a detekci anaerobních mikroorganismů ve vzorcích krve a jiných, normálně sterilních tělních tekutin odebraných pacientům podezřelým z bakteriémie/ fungémie.

Obsahují 40 ml média o složení: kasein natrávený pankreatickými enzymy, sojová hmota natrávená papainem, SPS, menadion, hemin, redukční agens a další komplex aminokyselin a karbohydrátových substrátů v purifikované vodě. Nádobky jsou připraveny pod vakuem v atmosféře CO₂ a dusíku.

Nádobky BacT/Alert SA

Používají se k získání a detekci aerobních mikroorganismů ve vzorcích krve a jiných, normálně sterilních tělních tekutin odebraných pacientům podezřelým z bakteriémie/fungémie.

Obsahují 40 ml média o složení: kasein natrávený pankreatickými enzymy, sojová hmota natrávená papainem, SPS, pyridoxin a další komplex aminokyselin a karbohydrátových substrátů v purifikované vodě. Nádobky jsou připraveny pod vakuem v atmosféře CO₂ a kyslíku (propagační materiály firmy Organon Teknika; Scharfen, 1995).

Tato média mají vysokou schopnost záchytu (98%) během prvních 72 hodin. Jsou určeny pro široký rozsah mikroorganismů, včetně vzácných a neobvyklých krevních patogenů (např. *Brucella melitensis*, *Campylobacter coli*, *Chromobacterium violaceum*, *Francisella tularensis*, *Rhodococcus equi* či *Vibrio cholerae*). Není nutné inukolované lahvičky okamžitě umístit do přístroje, ale mělo by se tak stát do 24 hodin po aplikaci vzorku.

2.12.3. Bactec

Bactec představuje automatizovaný hemokultivační systém umožňující detekci růstu mikroorganismů během inkubace. Výrobce je firma Becton Dickinson, Sparks, USA.

První přístroj tohoto typu byl uveden na trh v roce 1970. Diagnostika růstu mikroorganismů byla založena na radiometrickém stanovení. Kultivační médium obsahovalo glukózu se značeným uhlíkem ¹⁴C. Vlivem metabolické

činnosti bakterií byl vytvářen radioaktivní CO_2 , jehož tvorbu měřilo speciální čidlo. Počítač pak provedl vyhodnocení.

Modernější systémy Bactec 660, 730, 860 detekovaly tvorbu CO_2 fotometricky v oblasti infračerveného záření.

Poslední verze systému Bactec (Bactec 9120 a 9140) využívá k detekci CO_2 principu fluorescence. Hemokultivační nádobky mají na svém dně senzitivní vrstvu oddělenou od média speciální membránou propouštějící pouze CO_2 . CO_2 uvnitř senzitivní vrstvy reaguje s vodou za vzniku H_2CO_3 , přičemž klesá lokální pH. Přístroj vysílá každých 10 minut přes dno nádobky k senzitivní vrstvě paprsek o definované vlnové délce, aktivuje ji a ta se po vyzáření světla vrací do původního stavu. Množství a kvalita vyzářeného světla je závislá na pH. Detektor vyzářeného světla tedy nepřímo měří tvorbu CO_2 v nádobce.

Nádobky jsou inkubovány při 35°C a pravidelně protřepávány. Počítač vyhodnocuje signály z detektorů a hlásí opticky a akusticky pozitivitu hemokultur.



Obrázek 2: Hemokultivační systém Bactec 9240.

Hemokultivační nádobky pro Bactec řady 9000:

Standardní aerobní nádobky (Standard aerobic/F)

Nádobky obsahují 25 ml tekuté půdy na bázi sojového kaseinového hydrolyzátu, s přidavkem heminu, manadionu, SDS, glukózy, pyridoxinu a

kvasničného extraktu. Plynnou fází tvoří vzduch obohacený CO₂. V nádobce je podtlak umožňující nasátí 5 ml krve.

Standardní anaerobní nádoby (Standard anaerobic/F)

Nádoby obsahují 25 ml tekuté půdy, která je navíc (oproti aerobní nádobce) obohacena o savčí tkáňový lyzát, fruktózu, arginin, thioly (L-cystein), citrát sodný a fosfát draselný. Plynná fáze je tvořena směsí CO₂ a dusíku. Opět je zde podtlak umožňující nasátí 5 ml krve.

Nádoby Plus aerobic/F

Nádoby obsahují 25 ml tekuté půdy na bázi sojového kaseinového hydrolyzátu s přidavkem heminu, manadionu, glukózy, pyridoxinu, kvasničného extraktu a SDS. Navíc obsahují 16% neionogenních adsorpčních přísad (kuličky sorpční pryskyřice) a 1% kationtově-výměnných přísad (katex), které jsou určené k inaktivaci antibiotik a baktericidně působících složek krve a k inhibici hemokoagulace. Plynnou fází tvoří vzduch obohacený CO₂. V nádobce je podtlak umožňující nasátí 8-10 ml krve.

Média obsahující přísady inaktivující antibiotika vykazují vyšší záchyt klinicky významných mikroorganismů.

Nádoby Plus anaerobic/F

Nádoby obsahují 25 ml tekuté půdy, která je (oproti aerobní nádobce) obohacena o savčí tkáňový lyzát, fruktózu, arginin, thioly (L-cystein), citrát sodný a fosfát draselný. Navíc obsahují 16% neionogenních adsorpčních přísad (kuličky sorpční pryskyřice) a 1% kationtově-výměnných přísad (katex). Plynná fáze je tvořena směsí CO₂ a dusíku. Je zde podtlak umožňující nasátí 8-10 ml krve.

Pediatrické nádoby (Peds Plus/F)

Nádoby obsahují 40 ml tekuté půdy, která je obohacena (oproti aerobní nádobce) o savčí tkáňový lyzát a pyruát sodný, 10% neionogenních adsorpčních přísad a 1% kationtově-výměnných přísad. Plynné prostředí tvoří vzduch s přidavkem CO₂. Tyto nádoby jsou určeny pro objem krve 1-3 ml (Beneš et al., 1995).

Nádobky Myco/F Lytic

Nádobky jsou určeny pro detekci kvasinek, hub a mykobakterií z krve nebo sterilních tělních tekutin. Nádobky obsahují 40 ml tekuté půdy, která je obohacena o saponin (lyzační činidlo). Plynnou fází tvoří vzduch s přídavkem CO₂. Injikují se 1-5 ml krve.

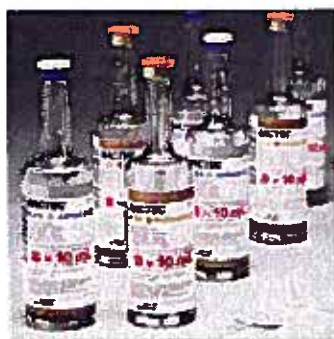
Nádobky Lytic anaerobic/F

Nádobky obsahují 40 ml tekuté půdy s SPS a saponinem. Plynná fáze je tvořena směsí CO₂ a dusíku. Injikují se 8-10 ml krve.

Nádobky Mycosis – IC/F

Nádobky jsou určeny pro selektivní kultivaci a záchyt kvasinek a plísň z krve.

Lahvičky obsahují 40 ml tekuté půdy tvořené vodou s mozko-srdcovou infuzí, sójo-kaseinovým hydrolyzátem, kvasničným extraktem, dextrozou, m-inositolem, citrátem železito-amonným, saponinem, odpěňovacím činidlem, SPS, chloramfenikolem a tobramycinem. Pro optimální záchyt je doporučována inokulace lahvičky vzorkem o objemu 8-10 ml.



Obrázek 3: Hemokultivační lahvičky systému Bactec.

2.12.4. Studie srovnávající hemokultivační systémy BacT/Alert a Bactec

Jedním z kritérií pro porovnávání těchto hemokultivačních systémů je hodnota TTD (time to detection). Přestože se hodnota TTD pro různé

mikroorganismy liší, není možné z tohoto kritéria jednoznačně usuzovat na konkrétní druh krevního patogenu.

Tabulka 1: Průměrný čas detekce (v hodinách) vybraných mikroorganismů kultivovaných v hemokultivačních systémech Bactec a BacT/Alert.

Mikroorganismus	TTD [h] – Bactec 9240	TTD [h]– BacT/Alert
<i>Streptococcus sp.</i>	16,3	16,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,9	18,8
<i>Enterobacteriaceae</i>	10,2	12,6
<i>Enterococcus spp.</i>	12,3	13,2
Kvasinky	41,0	31,4
Anaeroby	22,2	23,4

Oba systémy jsou srovnatelné z hlediska počítačového softwaru, ceny a poskytovaných technických služeb.

Podle studie prováděné Jorgensenem et al. (srovnávající média Bactec Plus aerobic/F a BacT/Alert aerobic FAN; 1997) jsou obě kultivační média srovnatelná ve schopnosti zachytu aerobních a fakultativních organismů. Vzorky z obou systémů byly pozitivní během 72 hodin. Detekce u systému Bactec byla nepatrně rychlejší. Větší rozdíly v průměrné hodnotě TTD byly znatelné pouze u streptokoků a kvasinek.

Srovnatelnost obou systémů z hlediska času detekce udávají i Ziegler et al. (1998). Přesto výsledky této studie ukazují rychlejší detekci gram-pozitivních bakterií u systému Bactec a naopak účinnější systém BacT/Alert pro detekci bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*.

Žádné statisticky významné rozdíly v detekci mikroorganismů mezi těmito systémy nebyly zaznamenány při kultivaci vzorků krve od pacientů podrobených antibiotické léčbě.

Pro systém Bactec 9240 byla stanovena standardní délka inkubace na 7 dní. Reisner et al. (1999) ve své studii uvádějí, že 4-denní inkubace postačuje pro záchyt všech klinicky důležitých bakterií a 6-denní inkubace je

dostačující pro záchyt kvasinek. Riley et al. ve své studii stanovili dobu inkubace pro systém BacT/Alert na 5 dní.

Předmětem studií se stala také otázka objemu vzorků. Je jisté, že vyšší množství inokulovaného vzorku poskytuje vyšší výtěžnost a vyšší rychlost detekce klinicky důležitých patogenů v krvi. Weinstein et al. ve své studii porovnávali výtěžnost u vzorků 5ml a 10ml. Uvádí vyšší pozitivitu u hemokultivačních lahviček inokulovaných 10ml vzorku pro *Escherichia coli* a ostatní druhy z čeledi *Enterobacteriaceae*, naopak nižší výtěžnost pro gram-pozitivní bakterie, nefermentující gram-negativní tyčky a kvasinky. V případě positivity u obou lahviček, rychlejší detekce nastala u 10ml inokulace.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. MATERIÁL

3.1.1. Biologický materiál

24-hodinové kultury mikroorganismů

Bacteroides fragilis

Citrobacter freundii

Escherichia coli

Enterobacter cloacae

Klebsiella oxytoca

Klebsiella pneumoniae

Proteus mirabilis

Salmonella enteritidis

Serratia marcescens

Acinetobacter baumannii

Burkholderia cepacia

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas stutzerii

Vzorky cévních katétrů odebrané hospitalizovaným pacientům

3.1.2. Pomůcky a přístroje

Zkumavky

Stojánek na zkumavky

Polštářky z buničiny

Automatická pipeta – Transferpette 20 – 200 µl

Skleněné pipety

Plastové kličky

Třepačka – Vortex Genie 2

Injekční stříkačky a jehly

Popisovače

Gumové rukavice

Hemokultivační systémy - Bactec 9240, Becton Dickinson, USA

- BacT/Alert 120 – bioMérieux, USA

BBL CRYSTAL™ - identifikační testy

Laminární box Jouan

Termostat 35-37°C

3.1.3. Roztoky a média

Zkumavky s 0,5. stupněm Mc Farlandovy zákalové stupnice (0,05ml
1% roztoku $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 9,95 ml 1% roztoku H_2SO_4)

Roztok lihobenzinu

Sterilní fyziologický roztok

Kultivační půdy - Petriho misky s krevním agarem (základ Columbia agar
Becton Dickinson s 10% beraní krve)

- Petriho misky s VL agarem

Hemokultivační lahvičky pro anaerobní bakterie - Bactec Lytic anaerobic/F

-BacT/Alert FAN anaerobic

Hemokultivační lahvičky pro aerobní bakterie - Bactec Standard aerobic/F

- Bactec Plus aerobic/F

- BacT/Alert SA

-BacT/Alert FA

3.2. METODY

3.2.1. Měření detekčních časů u gram-negativních bakterií

Pro experiment jsme vybrali nejčastěji se vyskytující bakteriální patogeny, které jsme identifikovali pomocí systému BBL CRYSTAL™ a růstových vlastností. Z čisté 24 – hodinové kultury daného mikroba jsme kličkou inokulovali zkumavku s 1,8 ml sterilního fyziologického roztoku a důkladně jsme ji protřepali na automatické třepače (2 minuty). Takto jsme připravili suspenzi, jejíž zákal musel odpovídat 0,5 stupni Mc Farlandovy zákalové stupnice. Tuto zkumavku jsme označili I.

Připravili jsme sadu 6 zkumavek obsahujících 1,8 ml sterilního fyziologického roztoku.

Ze suspenze I jsme odebrali automatickou mikropipetou 0,2 ml a přenesli do zkumavky s fyziologickým roztokem, kterou jsme protřepali na automatické třepače (2 minuty). Tuto zkumavku jsme označili jako II. Z této zkumavky jsme odebrali 0,2 ml suspenze a přenesli do další zkumavky s 1,8 ml fyziologického roztoku, kterou jsme označili jako III. Takto jsme pokračovali dále až do ředění VII. Připravili jsme si tak řadu sedmi zkumavek se snižující se koncentrací inokulovaného patogenu.

Ze zkumavek III – VII (ředění I a II jsme nepoužívali) jsme odebrali sterilní injekční stříkačkou se sterilní jehlou 0,2 ml do hemokultivačních nádobek systému Bactec. Stejně jsme postupovali u systému BacT/Alert. Před i po inokulaci jsme dezinfikovali gumové zátky lahvíček lihobenzinem. Lahvičky jsme popsali názvem mikroba a jeho koncentrací v roztoku a dali kultivovat. Ze zkumavek III – VII jsme dále odebrali automatickou pipetou se sterilní špičkou 0,1 ml roztoku a přenesli na Petriho misku s krevním agarem, kde jsme ho rozetřeli na celou plochu pomocí sterilní plastové kličky. Misky se živnou půdou jsme rovněž označili názvem a koncentrací mikroba a dali kultivovat do termostatu na 24 hodin při teplotě 37°C. U anaerobních kmenů jsme použili VL agar. Misky s VL agarem jsme kultivovali anaerobně v systému LAS. Po inkubaci jsme spočítali počet vyrostlých kolonií na miskách.

Po vyhodnocení positivity hemokultivačních nádobek systému Bactec a BacT/Alert jsme zjištěné detekční časy patogenů přiřadili k množství kolonií

spočítaných na příslušných agarových půdách, kam byl inokulován vzorek o stejné koncentraci mikrobů.

3.2.2. Stanovení detekčních časů mikroorganismů přítomných na povrchu vyjmutých katétrů

Do zkumavky se segmentem vyjmutého cévního katétru jsme napipetovali 5 ml sterilního fyziologického roztoku. Zkumavku jsme uzavřeli a obsah důkladně protřepali pomocí automatické třepačky (2 minuty).

Sterilní injekční stříkačkou se sterilní jehlou jsme odebrali celý objem roztoku ze zkumavky a vpravili jej propíchnutím gumové zátky do lahvičky na hemokultivaci. Zátku jsme před i po inokulaci desinfikovali lihobenzinem.

Celý pracovní postup probíhal v laminárním boxu s využitím dalších ochranných pomůcek (ochranný oděv, gumové rukavice,...).

Hemokultivační nádobku jsme řádně označili a dali kultivovat do příslušného hemokultivačního přístroje.

Bakteriální kultury izolované z pozitivních hemokultur jsme identifikovali na základě růstových a biochemických vlastností pomocí identifikačních testů BBL CRYSTAL™.

Na základě námi získaných závislostí detekčních časů na množství inokulovaných bakterií jsme mohli z hodnot detekčních časů suspenzí z vyjmutých katétrů odhadnout množství bakterií přítomných na povrchu katétru.

3.2.3. Statistické vyhodnocení

Východiskem byl předpoklad, že počet bakterií se zvyšuje exponenciálně podle vzorce $f(t) = b \exp(ct)$. Růst je posuzován podle chování derivace $f'(t) = bc \exp(ct)$. Dostatečně velká derivace byla posuzována pomocí rovnice $bc \exp(ct) = D$.

Předpokládané množství bakterií na počátku kultivace je označeno písmenem x . To znamená, že od počátku, kdy byla bakterie jen jedna, uplynul čas t_1 daný rovnicí $b \exp(ct_1) = x$. Z této rovnice bylo vypočteno $b = x \exp(-ct_1)$ a dosazeno do $bc \exp(ct) = D$. Tak byla získána rovnice $x \exp(ct_1) c \exp(ct) = D$,

dále rovnice $x \exp(ct-ct_1) = D$, $\exp(ct-ct_1) = D/(xc)$. Po zlogaritmování bylo $ct-ct_1 = \ln(D) - \ln(xc)$, $ct = \ln(D) - \ln(xc) - ct_1$ a konečně $t = \ln(D)/c - \ln(xc)/c - t_1$.

To znamená, že t je lineární funkcí $\ln(x)$.

Pro hodnocení byly použity jednoduché lineární regresní modely

$$Y_A = \alpha_A + \beta_A \ln(x) + \varepsilon_A$$

a

$$Y_B = \alpha_B + \beta_B \ln(x) + \varepsilon_B.$$

Shoda těchto dvou modelů byla hodnocena výpočtem rozdílu

$$Y_A - Y_B = (\alpha_A - \alpha_B) + (\beta_A - \beta_B) \ln(x) + (\varepsilon_A - \varepsilon_B).$$

Pro zjednodušení byl tento model přepsán jako

$$Y = \alpha + \beta \ln(x) + \varepsilon,$$

kde α představuje posun a β směrnici křivky. Tento model bylo možné snadno zpracovat a testovat hypotézu o parametrech α nebo β . Shoda obou parametrů znamenala shodu modelů.

4. VÝSLEDKY

K proměření detekčních časů jsme použili kmeny nejčastěji se vyskytujícími gram-negativními patogenů.

Závislost TTD obou systémů na počtu inokulovaných bakterií znázorňují tabulky. Z výsledků vyplývá, že detekční čas je závislý na množství inokulovaných bakterií. Čím vyšší byl počet inokulovaných CFU, tím byl detekční čas kratší.

4.1. DETEKČNÍ ČASY AEROBNÍCH GRAM-NEGATIVNÍCH BAKTERIÍ

U osmi z třinácti testovaných bakteriálních kmenů byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi TTD u použitých systémů. Tyto hodnoty jsou zaznamenány v tabulkách a zpracovány do grafů. Pětkrát byly kratší TTD v lahvičkách Bactec Plus Aerobic/F oproti systému BacT/Alert FA a dvakrát kratší v lahvičkách BacT/Alert SA oproti systému Bactec Standard Aerobic. Detekce enterobakterií je v lahvičkách Bactec Plus Aerobic o 1,5 – 3 hodiny kratší. V případě nefermentujících tyček je naopak rychlejší detekce *Acinetobacter baumannii* v lahvičkách BacT/Alert SA oproti lahvičkám Bactec Standard Aerobic/F. Největší rozdíl byl zjištěn u *Pseudomonas stutzerii*, kde byla detekce v lahvičkách BacT/Alert FA rychlejší až o 15 hodin oproti lahvičkám Bactec Plus Aerobic/F.

Naměřené hodnoty:

Tabulka 2: Detekční časy bakterie *Escherichia coli* zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.

CFU	TTD [h] BacT/Alert	TTD [h] Bactec
1	14,3	12,14
2	13,8	12,14
7	12,8	10,79
8	12,7	11,26
19	12,7	10,64
23	11,7	9,62
31	12,6	10,12
118	11,5	9,97
124	11,5	10,15
268	14,2	8,56
387	10,2	8,45
1060	9,8	8,64
2620	7,8	7,21
4220	9	6,79

Tabulka 3: Detekční časy bakterie *Klebsiella pneumoniae* zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.

CFU	TTD [h] BacT/Alert	TTD [h] Bactec
1	15,6	13,08
1	15,4	13,12
3	15,3	13,35
11	12,8	11,2
19	14,8	11,79
24	15,2	13,24
88	14,4	12,96
99	15	13
124	12	10,03
187	12,7	10,12
466	11,8	9,86
960	10,8	9,03
1640	11,7	9,12
2640	9,3	7,54

Tabulka 4: Detekční časy bakterie *Serratia marcescens* zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.

CFU	TTD [h] BacT/Alert	TTD [h] Bactec
1	15,2	12,8
8	15,1	11,29
10	14	11
43	14,1	10,48
135	12,4	9,96
168	12,5	9,8
684	12,3	8,81
1700	10,7	8,3

Tabulka 5: Detekční časy bakterie *Citrobacter freundii* zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.

CFU	TTD [h] BacT/Alert	TTD [h] Bactec
1	15,3	12,51
8	14,7	11,84
28	14	10,88
86	13,3	10,34
118	13,1	10,52
232	13,3	10,31
392	12,8	9,85
535	12	9,34
5600	12,2	9,17

Tabulka 6: Detekční časy bakterie *Proteus mirabilis* zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.

CFU	TTD [h] BacT/Alert	TTD [h] Bactec
3	17,1	11,94
16	15,4	11,56
35	15,5	10,87
48	14,7	10,54
58	15,2	11,02
350	13	8,7
437	12,8	8,58
3700	11,7	7,7

Tabulka 7: Detekční časy bakterie *Pseudomonas stutzerii* zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.

CFU	TTD [h] BacT/Alert	TTD [h] Bactec
1	34,5	52,93
2	35,8	46,37
9	31,2	44,98
32	34,1	43,29
105	28,6	43,01
138	26,7	42,1
568	22,7	37,76
820	23,1	36,28
2600	20,3	30,93

Tabulka 8: Detekční časy bakterie *Acinetobacter baumannii* zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.

CFU	TTD [h] BacT/Alert	TTD [h] Bactec
1	14,3	21,18
3	13,8	22,36
12	12,7	19,18
62	12,3	17,31
138	11,3	15,68
236	11,2	13,99
1100	10,2	12,55

4.2.DETEKČNÍ ČASY ANAEROBNÍCH GRAM-NEGATIVNÍCH BAKTERIÍ

Závislost TTD obou systémů na počtu inokulovaných bakterií znázorňuje tabulka. Všechny lahvičky Bactec Lytic měly výrazně kratší TTD oproti lahvičkám BacT/Alert FAN Anaerobic inokulovaných stejnou suspenzí téhož bakteriálního kmene.

Naměřené hodnoty:

Tabulka 9: Detekční časy bakterie *Bacteroides fragilis* zjištěné kultivací v automatických hemokultivačních systémech a příslušné hodnoty CFU.

CFU	TTD [h] BacT/Alert	TTD [h] Bactec
8		27,52
17		21,82
37		20,59
41		22,43
46	72	21,73
46	69,6	20,19
46	67,20	23,1
113	67,2	19,67
113	64,8	20,17
145		20,32
243		18,07
251		16,06
254		18,37
296	64,80	19,95
489		18,82
492	64,8	17,64
593	62,4	18,6
593	62,4	18,1
1280	57,6	17,65
1280	52,8	17,15
1513	48	15,03
1513	47,7	15,53

4.3. DETEKČNÍ ČASY BAKTERIÍ ZACHYCENÝCH Z POVRCHU VYJMUTÝCH KATÉTRŮ

Celkem 52 vyjmutých katétrů jsme upravili podle výše popsané metody pro zpracování klinických vzorků. Z tohoto počtu bylo 44 vzorků kultivováno v systému BacT/Alert a 8 vzorků v systému Bactec. Tento nepoměr byl dán dočasným nedostatkem hemokultivačních lahvíček pro přístroj Bactec.

Hemokultivace byla pozitivní u 29 kanyl. Jednalo se však o kolonizaci katétru gram pozitivními bakteriemi, zejména enterokoky a různými druhy stafylokoků. Nebyly zachyceny žádné gram-negativní bakterie.

Naměřené hodnoty:

Tabulka 10: TTD [h] mikrobů zachycených z povrchu katétrů a odpovídající počet CFU.

Hemokultivační přístroj	Mikrob	TTD [h]	CFU
BacT/Alert	Enterococcus faecalis	10,8	111
BacT/Alert	Enterococcus faecalis	7,7	357
BacT/Alert	Enterococcus faecalis	13,8	-
Bactec	Enterococcus faecalis	13,11	-
BacT/Alert	Staphylococcus epidermidis	29,5	-
BacT/Alert	Staphylococcus epidermidis	28,7	-
BacT/Alert	Staphylococcus epidermidis	43,2	-
BacT/Alert	Staphylococcus epidermidis	13,7	528
BacT/Alert	Staphylococcus epidermidis	21,3	206
BacT/Alert	Staphylococcus epidermidis	21,8	189
BacT/Alert	Staphylococcus epidermidis	29,8	-
BacT/Alert	Staphylococcus epidermidis	31,8	-
Bactec	Staphylococcus epidermidis	23,14	251
Bactec	Staphylococcus epidermidis	20,58	305
Bactec	Staphylococcus epidermidis	24,72	220
Bactec	Staphylococcus epidermidis	13,11	515
BacT/Alert	Staphylococcus haemolyticus	22,3	-
BacT/Alert	Staphylococcus haemolyticus	29,3	-
BacT/Alert	Staphylococcus haemolyticus	16,8	433
BacT/Alert	Staphylococcus haemolyticus	18,3	122
BacT/Alert	Staphylococcus haemolyticus	17	390
BacT/Alert	Staphylococcus haemolyticus	19,5	-
Bactec	Staphylococcus haemolyticus	21,93	-
Bactec	Staphylococcus haemolyticus	11,19	251
Bactec	Staphylococcus haemolyticus	18,15	-
BacT/Alert	Staphylococcus saprophyticus	26,8	-
BacT/Alert	Staphylococcus saprophyticus	20,7	16
BacT/Alert	Staphylococcus warneri	21,8	-
BacT/Alert	Staphylococcus warneri	18,3	171

4.4. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Tabulka 11: Statistické vyhodnocení závislosti TTD na počtu inokulovaných CFU - lahvičky se sorbentem.

	BacT/Alert FA	Bactec Plus Aerobic	Výsl.	p hodnota
<i>Escherichia coli</i>	$y = -0,6329\text{Ln}(x) + 14,404$	$y = -0,6155\text{Ln}(x) + 12,323$	Různé	0,0006215
<i>Enterobacter cloacae</i>	$y = -0,5715\text{Ln}(x) + 17,991$	$y = -0,9821\text{Ln}(x) + 19,199$	Shodné	0,7774431
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$y = -0,6605\text{Ln}(x) + 16,034$	$y = -0,6275\text{Ln}(x) + 13,802$	Různé	0,0003617
<i>Klebsiella oxytoca</i>	$y = -7454,4\text{Ln}(x) + 19586$	$y = -8414,5\text{Ln}(x) + 21071$	Shodné	0,3236596
<i>Serratia marcescens</i>	$y = -0,5968\text{Ln}(x) + 15,685$	$y = -0,5742\text{Ln}(x) + 12,612$	Různé	0,0001412
<i>Citrobacter freundii</i>	$y = -0,4114\text{Ln}(x) + 15,284$	$y = -0,4217\text{Ln}(x) + 12,448$	Různé	0,000084
<i>Salmonella enteritidis</i>	$y = -0,6749\text{Ln}(x) + 16,797$	$y = -0,5572\text{Ln}(x) + 13,292$	Různé	0,0006305
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$y = -1,4125\text{Ln}(x) + 26,126$	$y = -0,7891\text{Ln}(x) + 21,081$	Shodné	0,1164448
<i>Ainetobacter baumannii</i>	$y = -1,7187\text{Ln}(x) + 24,985$	$y = -1,2401\text{Ln}(x) + 21,81$	Shodné	0,5380559
<i>Escherichia coli</i>	$y = -1,7613\text{Ln}(x) + 31,015$	$y = -1,6527\text{Ln}(x) + 30,891$	Shodné	0,9629317
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	$y = -1,9779\text{Ln}(x) + 36,654$	$y = -2,2151\text{Ln}(x) + 51,031$	Různé	0,0000122

Tabulka 12: Statistické vyhodnocení závislosti TTD na počtu inokulovaných CFU - lahvičky bez sorbentu.

	BacT/Alert SA	Bactec Standard Aerobic	Výsl.	p hodnota
<i>Proteus mirabilis</i>	$y = -0,7888\text{Ln}(x) + 17,927$	$y = -0,6852\text{Ln}(x) + 13,156$	Různé	6,8455E-05
<i>Acinetobacter baumannii</i>	$y = -0,5839\text{Ln}(x) + 14,351$	$y = -1,4162\text{Ln}(x) + 22,543$	Různé	0,00095221

5. DISKUSE

V pokusech jsme porovnávali kultivace bakterií v hemokultivačních lahvičkách, které podle doporučení výrobců odpovídají stejnému použití. Lahvičky srovnávaných systémů se liší složením kultivační půdy i vlastním detekčním systémem. Fluorescenční detekce je obecně známa vyšší citivostí oproti kolorimetrické. Tato konstrukce umožňuje přístroji Bactec kratší detekční časy při stejných kultivačních vlastnostech použitých půd. Při kultivacích hraje vysokou roli složení tekuté kultivační půdy. Univerzální kultivační půda vhodná pro všechny významné bakteriální patogeny neexistuje. Vždy se jedná o kompromisní řešení, které upřednostňuje růst některých skupin bakterií. Tvůrci systému Bactec navrhli v případě aerobních lahviček se sorbentem kultivační prostředí vyhovující více enterobakteriím. Toto řešení lze považovat za optimální, protože pokrývá nejčastější původce infekcí krevního řečiště (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*) spojované s těžkým průběhem onemocnění (Vacek, 1994). S výjimkou *A.baumannii* vykazovaly všechny testované kmeny stejné nebo kratší detekční časy v lahvičkách systému Bactec.

U žádného z testovaných kmenů nebylo zaznamenáno selhání detekce nebo detekce pouze ve vyšších kvantitách CFU inokulovaných bakterií. Byly zjištěny pouze rozdíly v detekčních časech, které ale nemají větší praktický význam. Výjimku tvoří pouze *Pseudomonas stutzerii*, kde časový rozdíl 15 hodin znamená prodloužení diagnostiky o jeden den. Tato bakterie ale nepatří mezi často zachycované patogeny.

Možnost kvantifikace bakterií inokulovaných do hemokultivačních lahviček systémů BacT/Alert a Bactec nabízí využití těchto systémů pro kvantitativní mikrobiologické vyšetření cévních katétrů.

Všechny popsané metody pro kvantitativní vyšetření cévních katétrů s výjimkou Makiho rolovací metody jsou založeny na převedení bakterií z povrchu katétru do roztoku, který je poté kvantitativně zpracován. To znamená, že je z tohoto roztoku připraveno několik ředění, která jsou vyočkována na vhodné kultivační agarové půdy. Tato fáze s sebou nese určité problémy. Několikanásobné ředění vyžaduje velmi čisté prostředí a přesnou práci. Je časově náročná a ani materiálové náklady nejsou zanedbatelné

(několik misek s agarovou půdou, sterilní roztoky). Tuto druhou fázi je možné nahradit vstříknutím roztoku s bakteriemi do hemokultivační lahvičky a následnou kultivací v automatickém přístroji. V případě positivity se na základě druhu izolovaného agens a detekčního času stanoví množství inokulovaných mikroorganismů.

Kultivace v hemokultivační lahvičce zajišťuje dostatečně široké spektrum zachycených bakterií a vysoce kvalitní kultivační prostředí včetně atmosféry. Nespornou výhodou je úspora práce. Odpadá práce s přesnými objemy roztoků a snižuje se riziko chyby. V porovnání s ostatními používanými metodami je zde nízké riziko kontaminace vzorků. Zpracování vzorků umožňuje rovněž záchyt mikroorganismů z vnějšího i vnitřního povrchu katétrů.

Na základě těchto teoretických předpokladů byla vyvinuta metoda kvantitativní kultivace cévních katétrů v hemokultivačních lahvičkách a vyzkoušena v praxi. V první fázi byly stanoveny vztahy závislosti TTD na počtu inokulovaných mikroorganismů. Ve druhé fázi byla vypracována metodika zpracování cévního katétru. Bohužel se nepodařilo ověřit použitelnost této metody v klinické praxi, neboť jsme nezachytili z cévních katétrů žádné gram-negativní mikroorganismy. Počet vyšetřovaných kanyl nebyl dostatečně velký k zachycení méně často se vyskytujících G⁻ bakterií jako původců katéetrových infekcí.

6. ZÁVĚR

V této práci jsme se zabývali problematikou katérových infekcí a možnostmi jejich diagnostiky pomocí kvantitativního bakteriologického vyšetření s použitím hemokultivačních systémů Bactec a BacT/Alert.

V první části práce jsme se zaměřili na stanovení závislosti TTD na CFU u nejčastěji se vyskytujících gram-negativních patogenů. Získané hodnoty jsme statisticky zpracovali a zanesli do grafů. Hemokultivační lahvičky obou výrobců prokázaly vysoké schopnosti detekce bakteriálních patogenů. Ani v jednom případě nedošlo k selhání detekce. Byly zjištěny rozdíly v detekčních časech mezi oběma systémy, ty ale nemají pro diagnostiku infekcí krevního řečiště praktický význam.

Druhá část se zabývala možností využití automatických hemokultivačních přístrojů pro kvantitativní analýzu cévních katétrů. Popsaná metoda má řadu výhod oproti výše uvedeným technikám. Proti ředícím metodám je výrazně jednodušší. Neklade velké nároky na odbornost pracovníků a umožňuje v poměrně krátké době získání výsledků. Systémy umožňují záchyt i obtížně kultivovatelných mikrobů.

Z klinických vzorků cévních katétrů jsme nezachytili žádné gram-negativní bakterie, nemohli jsme tedy ověřit účinnost a použitelnost nové metody v klinické praxi. Ve všech případech pozitivní detekce patogenů se jednalo o gram-pozitivní koky. Je to z toho důvodu, že gram-negativní bakterie se jako původci katérových infekcí vyskytují méně často.

K prověření nové metody bude v budoucnosti nutno vyšetřit ještě velké množství cévních katétrů. Nicméně jedná se o zajímavou techniku, která si zaslouží pozornost a další výzkum.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J.: Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha 1996.
2. Bednář M., Souček A., Vávra J.: Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie. Triton, Praha 1994.
3. Beneš J.: Klinický pohled na sepsi. Klin. Mikrobiol. Inf. Lék., 2, 1996.
4. Beneš J., Gabrielová A., Horová B.: Naše zkušenosti s hemokultivačním systémem Bactec. Klin. Mikrobiol. Inf. Lék., 1, 1995, 15-19.
5. Beneš J., Gabrielová A., Horová B.: Výhody a nevýhody automatizovaných hemokultivačních systémů. Klin. Mikrobiol. Inf. Lék., 2, 1996, 44-48.
6. Beneš J., Gabrielová A., Horová B. et al.: Porovnání různých způsobů hemokultivačního vyšetření. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 3, 1996, 101-107.
7. Vacek V.: Současné pohledy na problematiku sepse. Epidemiol Mikrobiol Imunol 1994; 43: 5-15.
8. Čermák P., Kolář M., Látal T., Heinigeová B., Bartoníková N.: Frequency of gram-positive bacterial pathogens in bloodstream infections in the Czech Republic. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 794-795
9. Holub M.: Imunologické aspekty sepse. Klin Mikrobiol Inf Lék 1998; 4: 200-204.
10. Hyánek T., Jindrák V., Kavka B., Vaniš V.: První zkušenosti s monitorováním katérových infekcí na ARO Nemocnice Na Homolce. Klin Mikrobiol Inf Lék 2000; 6:189-192.
11. Kolář M., Látal T., Čermák P.: Frekvence gramnegativních patogenů u infekcí krevního řečiště a jejich rezistence k antibiotikům v České republice. Klin Mikrobiol Inf Lék 2002; 2: 61-67.
11. Jindrák V.: Nozokomiální infekce a současná medicína. Klin Mikrobiol Inf Lék 2000; 6: 166-171.
13. Šrámová H.: Výskyt sepsí v České republice. Epidemiol Mikrobiol Imunol 1995; 44: 155-160.

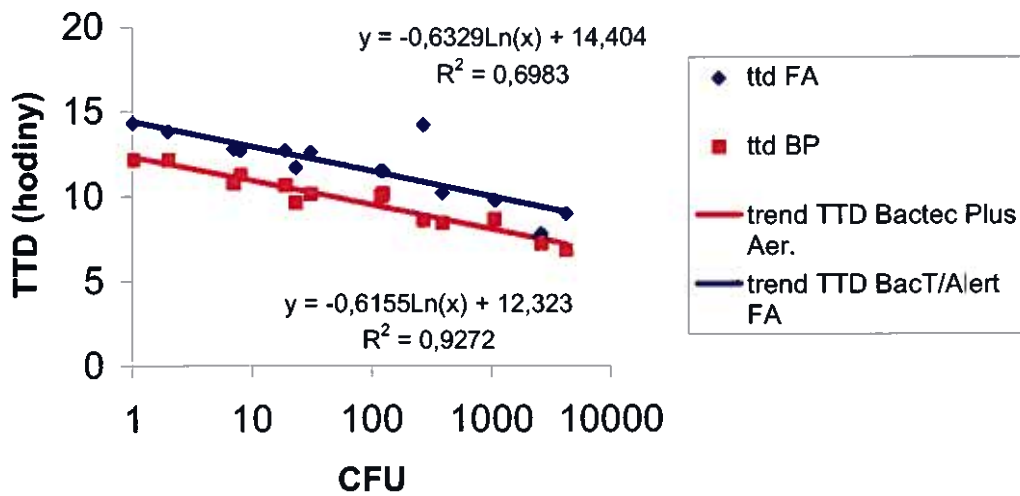
14. Černý V., Novák I., Cvachovec K. et al.: *Sepse v intenzivní péči*. Maxdorf, Praha 2002.
15. Hardy J.D., Hulbert B.B., Migneault P.C.: Time to detection of positive BacT/Alert blood cultures and lack of need for routine subculture of 5- to 7-day negative cultures. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2743-2745.
16. Čermák P., Pozlerová E., Morávková M., Zapomělová L.: Zkušenosti s provozem poloautomatického hemokultivačního systému BacT/Alert v průběhu tří let (1996-1998) ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. *Klin Mikrobiol Inf Léč* 2000; 6: 39-43.
17. Capdevita J. A. Catheter-related infection – An update on diagnosis, treatment and prevention, *International Journal of Infectious Diseases* 1998; 2: 203-207.
18. Ziegler R., Johnscher I., Martus P. et al.: Controlled clinical comparison of two supplemented aerobic and anaerobic media used in automated blood culture systems to detect bloodstream infections. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 657-661.
19. Jorgensen J.H., Mirrett S., McDonald L.C. et al.: Controlled clinical laboratory comparison of Bactec Plus aerobic/F medium with BacT/Alert aerobic FAN medium for detection of bacteremia and fungemia. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 53-58.
20. Svoboda P., Kantorová I., Řehořková D., Scheer P.: *Sepse v traumatologii a chirurgii*. Triton 2004.
21. Scharfen J.: Zkušenosti s automatizovaným vyšetřováním hemokultur v systému BacT/Alert. *Klin. Mikrobiol.*, 2, 1995, 7-13.
22. Potužník V.: *Klinická mikrobiologie sepse*. Avicenum, Praha 1978.
23. Neubauer M. et al.: *Metody kultivace a diagnostiky anaerobních bakterií*. Avicenum, Praha 1988.
24. Ševčík P. et al.: *Sepse v intenzivní medicíně*, Avicenum, Praha 1997.
25. Maki D.G., Weise C.E., Sarafin H.W.: A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977; 296: 1305-1309.
26. Cooper G.L., Hopkins C.C.: Rapid diagnosis of intravascular catheter-associated infection by direct gram staining of catheter segments. *N Engl J Med* 1985; 312: 1142-1147.

27. Kite P., Dobbins B.M., Wilcox M.H, et al.: Rapid diagnosis of central-venous-catheter related bloodstream infection without catheter removal. *Lancet* 1999; 354: 1504-1507.
28. Brun-Buisson C., Abrouk F., Legrand P. et al.: Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip cultures. *Arch Intern Med* 1987; 147: 873-7.
29. Cleri D.J., Corrado M.L., Seligman S.J.: Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. *Journ Infect Dis* 1980; 141 (6): 781 – 786.
30. Sherertz R.J., Raad I., Belani A. et al.: Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1990; 28:76-82
31. Sherertz R.J., Heard S.O., Raad I.: Diagnosis of triple-lumen catheter infection: comparison of roll plate, sonification, and flushing methodologies. *J Clin Microbiol* 1997; 35:641-6.
32. Linares J., Sitges-Serra A., Garau I. et al.: Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study with quantitative and semiquantitative cultures of catheter hub and segments. *J Clin Microbiol* 1985, 357-60
33. Sadoyama G.,Gontijo Filho P.P.: Comparison between the jugular and subclavian vein as insertion site for central venous catheters: microbiological aspects and risk factors for colonisation and infection. *Journ Infect Dis* 2003; 7 (2): 142 – 148.
34. Mermel L.A., McCormick R.D., Springman S.R., Maki D.G.: The pathogenesis and epidemiology of catheter-related infection with pulmonary artery Swan-Ganz catheters: a prospective study utilizing molecular subtyping. *Am J Med* 1991; 91(suppl): S197-S205.
35. Tighe M.J., Kite P., Fawley W.N., Thomas D., McMahon M.J.: An endoluminal brush to detect the infected central venous catheter in situ: A pilot study. *BMJ* 1996; 313 (7071): 1528 – 1529.
36. Fan ST, Teoh-Chan CH, Lau KF. Evaluation of central venous catheter sepsis by differential quantitative blood culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8: 142-144.

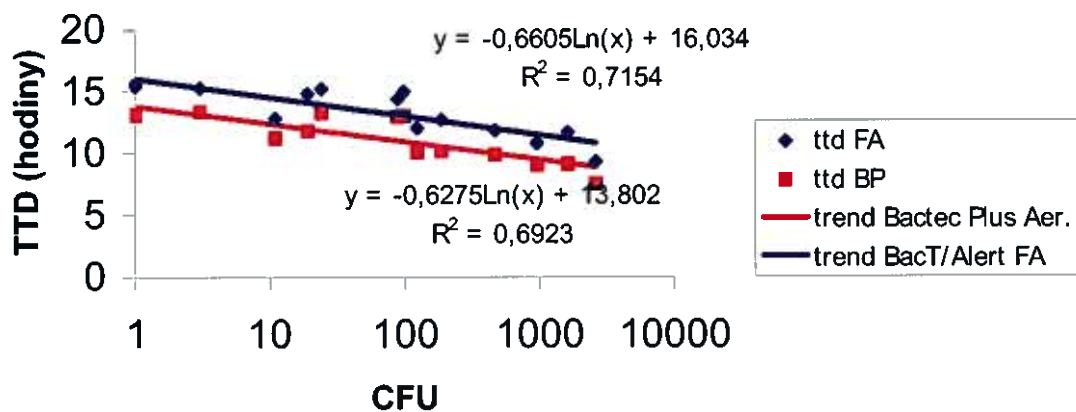
37. Capdevilla J.A., Planes A.M., Polomar M., et al.: Value of differential quantitative blood cultures in the diagnosis of catheter-related sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 403-407.
38. Blot F., Schmidt E., Nitenberg G. et al.: Earlier positivity of central venous versus peripheral blood cultures is highly predictive of catheter related sepsis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 105-109.
39. Blot F., Nitenberg G., Chachaty E. et al.: Diagnosis of catheter-related bacteremia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures. *Lancet* 1999; 354: 1071-1077.
40. Crnich C.J., Maki D.G.: The role of intravascular devices in sepsis. *Current Infectious Disease Reports* 2001; 3: 496-506.
41. Bryanth D.H., Thorpe T.C.: Enhanced recovery with the aerobic FAN culture bottle for the BacT/Alert microbial detection system. Organon Teknika Corp., INTERFACE, 1995.
42. Frank U., Malkotsis D., Mlangeni D. et al.: Controlled clinical comparison of three commercial blood culture systems. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, 248-255.
43. Mirett S., Everts R.J., Reller L.B.: Controlled comparison of original vented aerobic FAN medium with new nonvented BacT/Alert FA medium for culturing blood. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 2098-2101.
44. Motr P., Yurack J., Jasmine P. et al.: Comparison of the Bactec 9240 and BacT/Alert systems using seeded blood cultures: Effect of delayed entry of bottles. 95th General meeting ASM; 1995 May, Washington, 1995.
45. Reisner B.S., Woods G.L.: Times to detection of bacteria and yeasts in Bactec 9240 blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 2024-2026.
46. Reklamní materiál firmy bioMérieux
47. Reklamní materiál firmy Organon Teknika

PŘÍLOHA

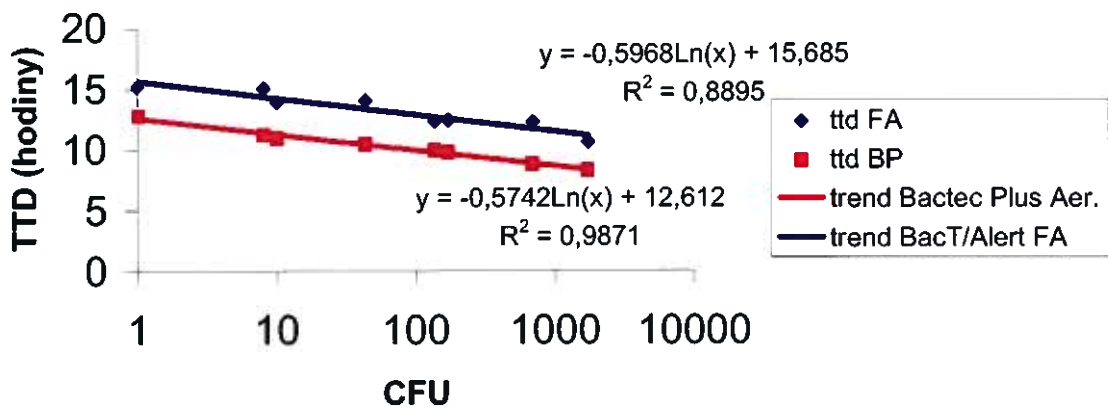
GRAFY ZÁVISLOSTI TTD NA CFU
GRAM-NEGATIVNÍCH BAKTERIÍ



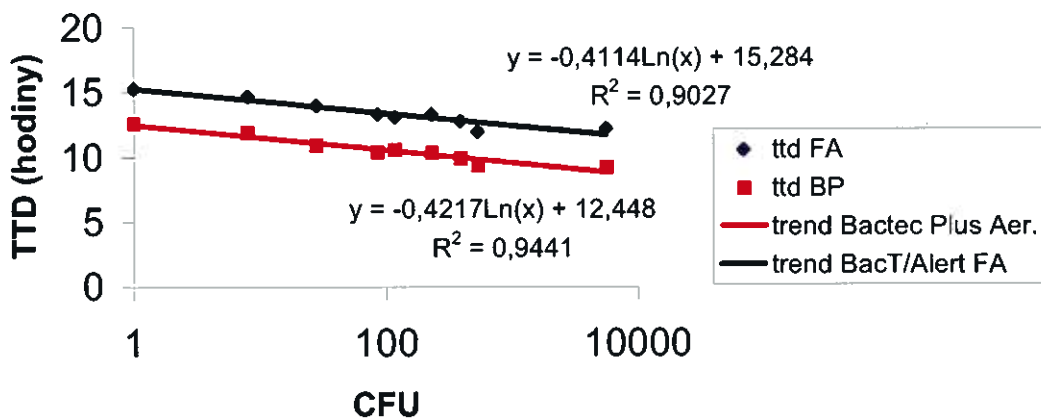
Graf 1: Závislost TTD [h] na množstvi inokulovaných CFU bakterie *Escherichia coli*. Kultivace v lahvičkách BacT/Alert FA a Bactec Plus Aerobic.



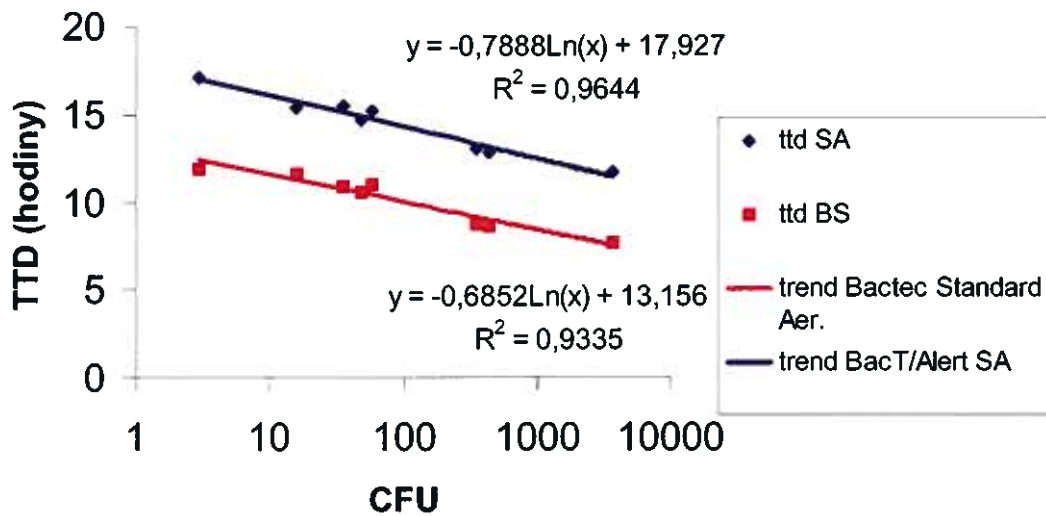
Graf 2: Závislost TTD [h] na množstvi inokulovaných CFU bakterie *Klebsiella pneumoniae*. Kultivace v lahvičkách BacT/Alert FA a Bactec Plus Aerobic.



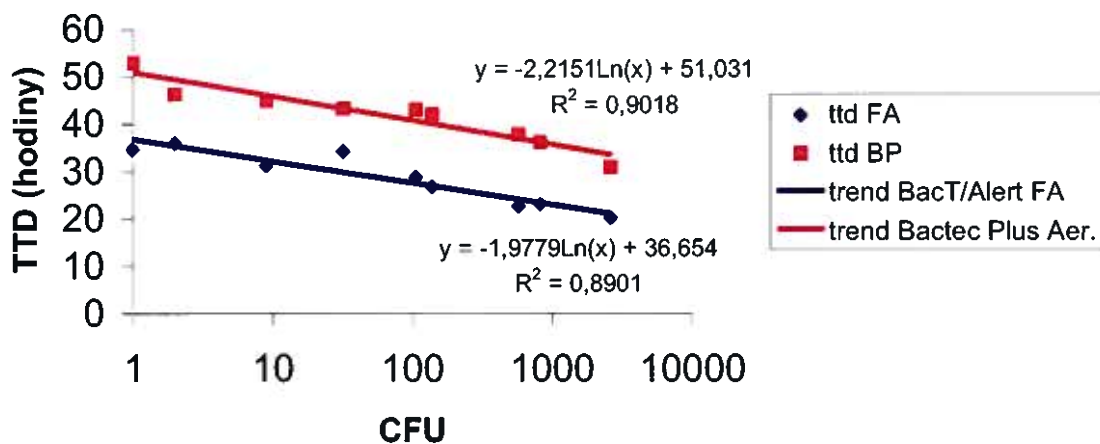
Graf 3: Závislost TTD [h] na množstve inokulovaných CFU bakterie *Serratia marcescens*. Kultivace v lahvičkách BacT/Alert FA a Bactec Plus Aerobic.



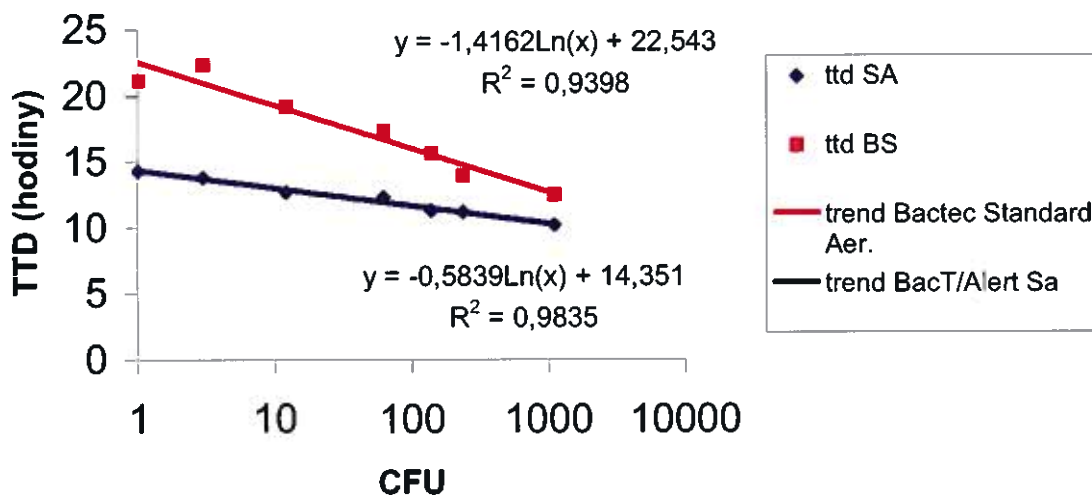
Graf 4: Závislost TTD [h] na množstve inokulovaných CFU bakterie *Citrobacter freundii*. Kultivace v lahvičkách BacT/Alert FA a Bactec Plus Aerobic.



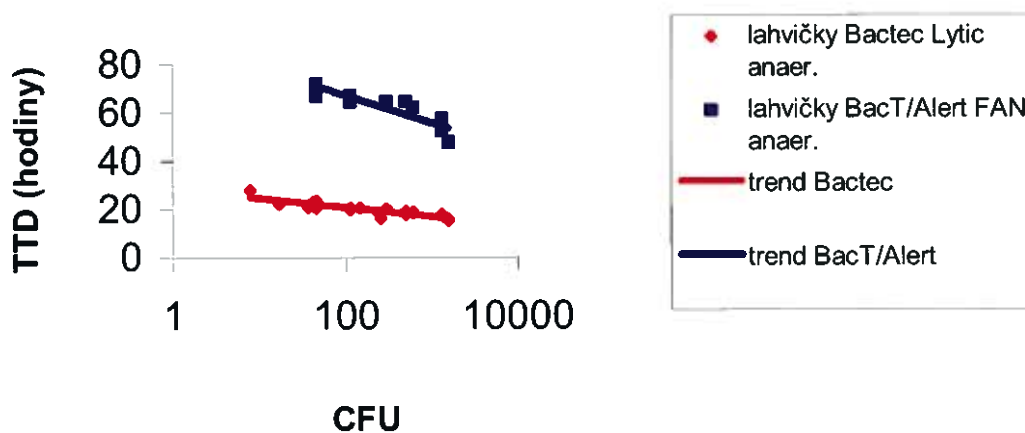
Graf 5: Závislost TTD [h] na množství inokulovaných CFU bakterie *Proteus mirabilis*. Kultivace v lahvičkách BacT/Alert SA a Bactec Standard Aerobic.



Graf 6: Závislost TTD [h] na množství inokulovaných CFU bakterie *Pseudomonas stutzerii*. Kultivace v lahvičkách BacT/Alert FA a Bactec Plus Aerobic.



Graf 7: Závislost TTD [h] na množství inokulovaných CFU bakterie *Acinetobacter baumannii*. Kultivace v lahvičkách BacT/Alert SA a Bactec Standard Aerobic.



Graf 8: Závislost TTD [h] na množství inokulovaných CFU bakterie *Bacteroides fragilis*. Kultivace v lahvičkách BacT/Alert FAN a Bactec Lytic Anaerobic.