

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Bakalářská práce

2016 Šárka Baláčková

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd



SEPTICKÉ STAVY NOVOROZENCŮ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí bakalářské práce: Pharm. Dr. Voxová Barbora

Školitel bakalářské práce: MUDr. Dvořáková Lenka

Hradec Králové, 2016

Šárka Baláčková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala Pharm. Dr. Barboře Voxové, za konzultace, odborné vedení a cenné rady při tvoření práce. Dále prim. MUDr. Lence Dvořákové, za poskytnutí odborné konzultace, pomoc a připomínky během zpracování dat a práce samotné. Moje poděkování patří Petře Kubešové, DiS. a všem ostatním spolupracovníkům. Chtěla bych poděkovat i dětem za jejich trpělivost a podporu po celou dobu mého studia.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato bakalářská práce „Septické stavy novorozenců“ je mým původním dílem a texty, data a jejich zdroje, které byly použity k práci, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného titulu.

V Hradci Králové, dne 25. 4. 2016

.....

ABSTRAKT

Autor: Šárka Baláčková

Název: Septické stavy novorozenců

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: zdravotní laborant

Cíl práce: Cílem práce bylo shromáždit informace o problematice septických stavů u novorozenců. Popsat laboratorní diagnostiku vyšetření novorozenecké sepsy a zmapovat výskyt nejčastějších patogenů způsobujících toto onemocnění na oddělení klinické mikrobiologie Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem.

Metoda: Sledování počtu odebraných hemokultur na novorozeneckém oddělení v období 2011–2015. Porovnání celkového počtu všech odebraných hemokultur k počtu pozitivních hemokultur a výskyt jednotlivých patogenů způsobujících novorozeneckou sepsi.

Výsledky: Během sledovaného období bylo odebráno celkem 5271 hemokultur. Z tohoto celkového počtu bylo pozitivních 1047, což činí 20 %. V zastoupení jednotlivých patogenů jako vyvolatelů novorozenecké sepsy jsou na prvním místě jednoznačně koagulázanegativní stafylokoky s počtem 801 záchytů, což je až 76,5 %. Dále následují gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky počtem 113 záchytů (10,8 %), anaerobní bakterie 48 záchyty (4,6 %), rod *Enterococcus* 31 záchyty (3,0 %), *Staphylococcus aureus* 26 záchyty (2,5 %), rod *Streptococcus* 21 záchyty (2,0 %) a nakonec kvasinky 7 záchyty (0,7 %).

Závěr: Septický stav u novorozence je závažné onemocnění, které se bude ještě dlouhou dobu opírat o hemokultivační vyšetření. Zachycení původce tohoto onemocnění, jeho určení a stanovení citlivosti je předpokladem úspěšné léčby. Automatizované hemokultivační systémy, které se využívají k diagnostice sepsí, poskytují rychlé a spolehlivé výsledky. Přístroje VersaTREK/ESP kultivační systém II, BacT/Alert 3D a MALDI-TOF umožňují zkrátit identifikaci a pomoc tak v záchraně novorozence.

Klíčová slova: Sepse, novorozenec, hemokultura, kultivace bakterií.

ABSTRACT

Author: Šárka Baláčková

Title: Septic states of newborns

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Field of study: medical laboratory technician

Background: The aim of the work was to sample information on the issue of septic states of newborns, to describe laboratory diagnosis of examining neonatal sepsis. To map rate of the most common pathogens causing this illness in Masarykova hospital in Ústí nad Labem.

Method: Tracking of sampled blood cultures at neonatal department between years 2011–2015. Comparison of total amount of blood cultures with the amount of positive blood cultures and the rate of particular pathogens causing neonatal sepsis.

Results: During the reporting period were collected a 5271 blood cultures to total count. 1047 of those were positive, making it 20 %. The most prominent causes of neonatal sepsis is above all coagulase-negative *Staphylococcus* with the count of 801 occurrences, which is 76,5 %. Followed by Gram-negative facultative anaerobic rods with 103 occurrences (10,8 %), Anaerobic bacteria with 48 counts (4,6 %), *Enterococcus* species with 31 counts (3%), *Staphylococcus aureus* with 26 counts (2,5 %), *Streptococcus* species with 21 counts (2 %) and Yeasts with 7 counts (0,7 %).

Conclusions: Neonatal septic state is a serious illness, which will be based of examination of blood on cultivation for a long time. Capturing the cause of this illness, its determination and determining the sensitivity implies a successful treatment. Automated systems for blood cultivation used for sepsis diagnosis provide fast and reliable results. VersaTREK/ESP cultivation system II device, BacT/Alert 3D device and MALDI-TOF device can make faster the identification and can be as help in the saving of a newborn.

Keywords: Sepsis, newborn, blood culture, cultivation of bacteria.

Obsah:

1. Úvod	9
2. Zadání práce – cíl práce.....	10
3. Teoretická část.....	11
3.1. Definice stavů spojených s přítomností mikroorganismů v krevním řečišti....	11
3.1.1. Infekce	11
3.1.2. Bakteriémie	11
3.1.3. Sepsa	12
3.1.4. Těžká sepsa	12
3.1.5. Septický šok.....	12
3.1.6. Syndrom mnohočetného orgánového selhání	12
3.1.7. Syndrom systémové zánětové odpovědi organismu (SIRS).....	12
3.1.8. Novorozenecká sepsa.....	13
3.2. Fyziologie a klasifikace novorozence	13
3.2.1. Vztah porodní hmotnosti ke gestačnímu věku.....	13
3.2.2. Délka těhotenství	14
3.2.3. Zralost novorozence.....	14
3.3. Novorozenecká sepsa	14
3.3.1. Incidence	15
3.3.2. Klinický obraz novorozenecké sepsy.....	15
3.3.3. Časná sepsa	16
3.3.4. Pozdní sepsa.....	16
3.3.5. Nozokomiální infekce.....	16
3.4. Nejčastější původci novorozenecké sepsy	17
3.4.1. Rod Staphylococcus.....	17
3.4.1.1. Stafylokoky koagulázapozitivní	17
3.4.1.2. Stafylokoky koagulázanegativní	18
3.4.2. Rod Streptococcus	19
3.4.3. Rod Enterococcus	20
3.4.4. Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky.....	20
3.4.5. Anaerobní bakterie.....	22
3.4.6. Kvasinky	23
3.5. Terapie.....	24
3.5.1. Kauzální terapie	24
3.6. Faktory ovlivňující výsledek vyšetření infekcí krevního řečiště	25
3.6.1. Místo odběru vzorku	25
3.6.2. Doba odběru vzorku.....	25

3.6.3.	Objem a odběr vzorku.....	26
3.6.4.	Transport a skladování hemokultur	26
3.7.	Hemokultivační systémy.....	27
3.7.1.	Historie kultivačního průkazu bakterií	27
3.7.2.	Hemokultivační systémy.....	27
3.7.3.	Manuální hemokultivační systémy	28
3.7.3.1.	Klasická hemokultura.....	28
3.7.3.2.	Dvoufázová hemokultura (Castagnedova)	28
3.7.3.3.	Hemokultura s detekčním systémem na základě tlaku plynu - Signal (Oxoid).....	28
3.7.4.	Automatizované hemokultivační systémy	29
3.7.4.1.	Otevřené systémy detekující radioaktivní CO ₂	29
3.7.4.2.	Otevřené systémy detekující spektrofotometricky CO ₂	29
3.7.4.3.	Uzavřené systémy detekující spektrofotometricky CO ₂	29
3.7.4.4.	Kontinuálně monitorující hemokultivační systémy.....	29
3.7.4.5.	Spektrofotometrická detekce CO ₂ pomocí senzoru.....	30
3.7.4.5.1.	BacT/Alert 3D.....	30
3.7.4.6.	Detekce pozitivita pomocí plynu.....	31
3.7.4.6.1.	VersaTREK/ESP kultivační systém II	31
4.	Praktická část.....	33
4.1.	Zpracování hemokultur a kultivační průkaz bakterií	33
4.1.1.	Mikroskopie	33
4.1.2.	Kultivace a kultivační půdy	35
4.1.2.1.	Krevní agar	35
4.1.2.2.	MacConkeyho agar.....	35
4.1.2.3.	Sabouraudův agar	35
4.1.2.4.	Schaedlerův agar	36
4.1.2.5.	Mueller–Hinton agar	36
4.1.3.	Zpracování pozitivních hemokultur	36
4.1.4.	Identifikace bakterií	36
4.1.4.1.	MALDI-TOF	36
4.1.5.	Stanovení citlivosti na antibiotika.....	38
4.1.5.1.	Disková difúzní metoda.....	38
4.1.5.2.	Diluční metoda v mikrodestičkách	39
5.	Výsledky.....	40
6.	Diskuze	48
7.	Závěr.....	51

8.	Zkratky	52
9.	Seznam tabulek.....	53
10.	Seznam grafů	54
11.	Seznam obrázků.....	55
12.	Použitá literatura	56

1. Úvod

Mikroorganismy se na Zemi vyskytují už tři miliardy let. Jsou součástí různých ekosystémů a vzájemné vztahy mezi jednotlivými organismy hrají velmi důležitou úlohu pro stabilitu tohoto systému. Přírozená mikrobiota osídluje člověka od narození. Za normálních okolností jsou pro člověka nepatogenní, ale pokud dojde k poruše rovnováhy a vniknutí mikroorganismů do sterilního krevního řečiště, vede to k rozvoji sepse. Vznik sepse může mít za následek stav ohrožující život. Velkou roli zde hraje imunitní systém člověka.

Novorozenecká sepsa pro svoji vysokou morbiditu je v popředí zájmu neonatologů. Imunitní systém se během života vyvíjí, a tak je přirozené, že nevyzrálý imunitní systém ohrožuje novorozence více než dospělého člověka.

Pro vyšetření původce septického stavu se odebírá krev na hemokultivaci. Její rychlá diagnostika a odhalení původce hraje velkou roli v záchraně života novorozence. Je potřeba co nejdříve identifikovat zdroj sepse, aby bylo možno eliminovat a zabránit opakovaným septickým příhodám. Diagnostika infekcí krevního řečiště se opírá o hemokultivaci. Dlouhé kultivační metody jsou už dnes nahrazovány automatizovanými systémy, které nabízejí rychlou identifikaci původce sepse a tím možnost zahájit cílenou léčbu a hlavně včasnou. Tyto systémy signalizují ihned pozitivitu vzorku. Nejprve je zhotovena mikroskopie, která pomůže orientačně zařadit původce sepse, poté se přistupuje ke kultivaci, identifikaci a stanovení citlivosti na antibiotika. Výsledek vede k rychlé a cílené léčbě sepse a většinou záchraně života.

2. Zadání práce – cíl práce

Hlavním cílem mé práce je popsat a přiblížit laboratorní diagnostiku septických stavů u novorozenců v Masarykově nemocnici v Ústí nad Labem (dále jen MNUL) v letech 2011–2015 a zjistit poměr pozitivních hemokultivací k celkovému množství odebraných hemokultur vzhledem k časovému vývoji sepse.

Dále zjistit výskyt nejčastějších etiologických agens a jejich zastoupení v souvislosti s rozvojem novorozenecké sepse a přiblížit standartní operační postupy, které se používají na oddělení Klinické mikrobiologie v Masarykově nemocnici v Ústí nad Labem (dále jen OKM v MNUL) k identifikaci sepse.

3. Teoretická část

3.1. Definice stavů spojených s přítomností mikroorganismů v krevním řečišti

Popis definice sepse učinil v roce 1914 Schotmüller, který zdroj sepse spatřoval v ložisku v organismu, z kterého trvale nebo pravidelně pronikají mikroorganismy do oběhu. Jejich přítomnost je příčinou subjektivních obtíží, ale i objektivních příznaků. (1)

V roce 1991 definovaly American College of Chest Physicians a Society of Critical Care Medicine na své Konsenzuální konferenci kritéria jednotlivých stádií infekce: bakteriémie, sepe, těžká sepe, septický šok a multiorgánové selhání. V této době došlo k zavedení pojmu - systémová zánětlivá reakce (SIRS, *systemic inflammatory response syndrome*), která označuje rozvoj systémových známek zánětu za univerzální reakci organismu na řadu ataků. (1)

3.1.1. Infekce

Infekce je zánětlivá obranná reakce organismu na kontakt s mikroorganismem nebo na atak mikroorganismů do sterilních tkání.

3.1.2. Bakteriémie

Bakteriémie vyjadřuje pouze fakt přítomnosti životaschopných bakterií v krvi. Může či nemusí být příčinou vyvolání infekce krevního řečiště. (2)

Bakteriémie může být přechodná, kontinuální nebo intermitentní.

- *Přechodná bakteriémie*: Jedná se o krátkodobý výskyt bakterií v krvi. Objevuje se třeba při čištění zubů, malých chirurgických zákrocích. Zde dochází během krátkého intervalu k odstranění imunitním systémem.
- *Intermitentní bakteriémie*: Ve skutečnosti je to přechodná opakující se bakteriémie, ale i zde dochází k odstranění obrannými mechanismy člověka.
- *Kontinuální bakteriémie*: Představuje závažnou infekci, která překonala obranu hostitele a kterou imunitní systém už není schopen odstranit. (3)

3.1.3. Seps

Seps představuje systémovou zánětlivou reakci organismu na infekci způsobenou opakovaným nebo trvalým vyplavováním patogenních mikrobů ze septického ložiska do krve, a tím do celého organismu. Mikroorganismy nabývají převahu nad obrannými silami organismu, ten je už nedokáže zneškodnit. (4)

Seps je charakterizována dvěma nebo více symptomy. Tělesná teplota je vyšší než 38 °C nebo nižší než 36 °C, zrychlené dýchání, leukocytóza nebo leukopenie, nebo 10 % nezralých forem leukocytů. Srdeční činnost je zrychlená, a to až 90 tepů/minutu. (5)

3.1.4. Těžká seps

Těžká seps je spojena s dysfunkcí orgánů, sníženou perfuzí, hypotonií, sníženým krevním průtokem, oligurií, poruchou vědomí a laktátovou acidózou.

3.1.5. Septický šok

U septického šoku přetrvává hypotonie i přes adekvátní plnění objemu cévního řečiště. Dochází k orgánové dysfunkci, objevuje se laktátová acidóza, oligurie, poruchy vědomí.

3.1.6. Syndrom mnohočetného orgánového selhání

Jedná se o stav, kdy je přítomná alterace dvou a více orgánových systémů. Nevyhnutelně vyžaduje léčebnou intervenci na udržení homeostázy organismu. Primární syndrom mnohočetného orgánového selhání má neinfekční původ (trauma, popálení a jiné příčiny). Sekundární syndrom mnohočetného orgánového selhání je vyvolán těžkou sepsí provázenou septickým šokem s hypoperfuzí orgánů. (2)

3.1.7. Syndrom systémové zánětlivé odpovědi organismu (SIRS)

Jedná se o systémovou zánětlivou reakci na různé klinické inzulty. Tato reakce je závažnou systémovou odpovědí organismu na nadprahovou zevní noxu, v našem případě infekci. SIRS je první fází seps a spouští imunologicko-zánětlivou kaskádu. Charakteristická je přítomnost dvou či více symptomů:

- tělesná teplota je vyšší než 38 °C nebo nižší než 36 °C
- zrychlené dýchání
- leukocytóza
- srdeční frekvence je větší než 90 tepů za minutu

3.1.8. Novorozenecká sepe

Novorozenecká sepe je systémové onemocnění, které je doprovázeno bakteriemií vyskytující se během prvního měsíce života. Novorozenecké sepe a její příznaky jsou široké. Bakteriální infekce centrálního nervového systému může probíhat buď přímo, nebo sekundárně. Dochází k poruchám spojených s ischemií, krvácením nebo poruchami průtoku mozku s následným edémem. Zároveň se přidružují další příznaky jako je třeba hypertermie, respirační poruchy, cyanóza, ikterus a další. Rozlišujeme dle klinické manifestace dvě formy sepe, časnou a pozdní. (5)

3.2. Fyziologie a klasifikace novorozence

Stav dítěte bezprostředně po porodu je určen jeho genetickým kódem, a potom ještě vlivy působícími v průběhu těhotenství a za porodu.

Novorozence můžeme bezprostředně po porodu zařadit do skupin, které mají vysokou výpovědní hodnotu z hlediska posouzení prenatálního vývoje, ale i z hlediska prognózy možné morbidity nebo mortality. V klasifikaci novorozence se uplatňuje délka těhotenství a vztah porodní hmotnosti ke gestačnímu věku. (6)

Fyziologický novorozenec je zralý, zdravý, eutrofický (eutrofie = dobře vyživovaný jedinec), narozený v termínu (od 38. do 42. týdne gestace), má hmotnost 2500–4500 gramů, délka 48–55 cm. (6)

Klasifikace novorozenců je možná z několika hledisek. Podle délky těhotenství, zralosti a dle vztahu porodní hmotnosti ke gestačnímu věku.

3.2.1. Vztah porodní hmotnosti ke gestačnímu věku

Zde dělíme novorozence na:

- *eutrofické* (stav odpovídá gestačnímu věku)
- *hypotrofické* (porodní hmotnost je nízká než odpovídající gestačnímu věku)
- *hypertrofické* (hmotnost je vyšší než odpovídající gestačnímu věku).

3.2.2. Délka těhotenství

Podle gestačního stáří můžeme novorozence klasifikovat jako:

- *donošené* (porozené od 38. do 42. týdne těhotenství)
- *nedonošené* (narozené ve 37. týdnu gravidity a dříve)
- *přenášené* (porozené ve 43. týdnu gestace a později).

S délkou těhotenství souvisí zralost novorozence.

3.2.3. Zralost novorozence

Dle zralosti dělíme novorozence na:

- *extrémně nezralé* (narozené do ukončení 28. týdne gestace s hmotností 999 gramů)
- *velmi nezralé* (narozené do 32. týdne gestace s váhou 1000–1499 gramů)
- *středně nezralé* (narozené do 34. týdne gestace s hmotností 1500–1999 gramů)
- *lehce nezralé* (narozené do 38. týdne gestace, s hmotností okolo 2000–2499 gramů).

Můžeme se také setkat s pojmy rizikový a patologický novorozenec. Rizikový novorozenec se rodí matce z rizikového těhotenství nebo se v průběhu porodu dostane do rizikové situace. Patologický novorozenec je dítě s hmotností pod 1500 gramů nebo novorozenec ohrožený na životě. (6)

3.3. Novorozenecká seps

Seps je u novorozence velmi vážný stav ohrožující život dítěte. Jde o multiorgánové onemocnění, které způsobují mikroorganismy a jejich toxické metabolické produkty. Průběh infekce a její přechod do septického stavu bývá u novorozence velmi rychlý. Postupuje od prvních diskrétních příznaků infekce až k plnému rozvoji septického stavu v desítkách minut až hodin. Z toho vyplývá nutnost zahájit při podezření na rozvíjející se neonatální sepsi okamžitě veškerá dostupná diagnostická vyšetření a je potřeba co nejdříve přistoupit k léčbě. I když třeba ještě nejsou k dispozici výsledky vyšetření. (5)

3.3.1. Incidence

Systémové bakteriální infekce jsou častou příčinou závažné morbidity a mortality novorozenců, a to hlavně novorozenců nezralých. Riziko novorozenecké infekce závisí na gestačním stáří novorozenců. Nezralý novorozenec je ohrožen daleko více. Výskyt časně novorozenecké sepse je udáván v rozmezí 1–10 na 1000 živě narozených dětí. U novorozenců, s porodní hmotností pod 1500 gramů, dosahuje incidence časně novorozenecké infekce 15–25 na 1000 živě narozených. U nezralých novorozenců, kteří vyžadují dlouhodobou intenzivní péči, se incidence pozdních nozokomiálních infekcí pohybuje v rozmezí 11–30 %. (7)

S klesající porodní hmotností se mortalita novorozenců se sepsí zvyšuje. Procento postižených novorozenců se zvyšuje s jejich nezralostí, jako i s porodnickými riziky (např. předčasný odtok plodové vody, chorioamniální infekce). Fyziologicky snížená obranyschopnost novorozence následně vyvolává neschopnost lokalizace infekčního procesu a bakteriemie. Účinnost všech ochranných bariér novorozence se snižuje s jeho nezralostí, hypoxií nebo metabolickými poruchami, které jsou spojené s bakteriální infekcí. Pozdní sepse jsou často spojeny s nozokomiální infekcí. (4)

Zvláštní skupinu rizikových pacientů představují časně narození novorozenci. Většina jejich zdravotních problémů vyplývá z funkční nevyzrálosti orgánových systémů. Nedonošené děti jsou vzhledem k nezralosti imunitního systému extrémně vnímavé k různým infekcím. V jejich etiologii se uplatňují kromě jiných i mnohé bakterie, které jsou součástí přirozené mikroflóry lidského těla. Na vysoké incidenci novorozeneckých sepsí se podílí několik různých faktorů:

- nezkušený a nevyzrálý imunitní systém v humorální i buněčné složce
- nízké množství transplacentárně přenesených mateřských IgG protilátek, a to hlavně u nezralých novorozenců
- nedostatečná bariérová funkce nezralé kůže a sliznic, zvláště zažívacího a dýchacího traktu
- invazivní diagnostické a terapeutické postupy
- používání antibiotik na JIP (7)

3.3.2. Klinický obraz novorozenecké sepse

Sepsi bychom charakterizovali jako systémovou zánětlivou reakci makro-organismů, které jsou detekovatelné v primárně sterilních tělních tekutinách. (5)

U novorozence je sepsa systémové onemocnění, které je doprovázeno bakteriemií vyskytující se během prvního měsíce života. Rozlišujeme dle klinické manifestace dvě formy sepsy, časnou a pozdní.

3.3.3. Časná sepsa

Časná sepsa se z časového hlediska klinicky rozvíjí do 72 hodin po porodu. (4) Jedná se většinou o superakutně probíhající multisystémová onemocnění, rychle postupující do septického šoku. Onemocnění se často projevuje jako septikémie bez přesné lokalizace či jako meningitida. Z hlediska patogeneze onemocnění jde o přenos infekčního agens z matky na novorozence. Přenos může nastat transplacentárně, hematogenní cestou při bakteriemií matky. Další možností jsou infekce, při kterých došlo k infikování plodových obalů, plodové vody a plodu. Přenos z matky na plod je možný i během porodu průchodem novorozence infikovanými porodními cestami. (7)

3.3.4. Pozdní sepsa

Pozdní sepsa se projevuje po 7. dni života dítěte. Sepsa nemá tak rychlý průběh. Často probíhá jako sepsa s lokalizovanou infekcí. Z hlediska patogeneze se většinou jedná o přenos infekce z okolního prostředí na dítě. (7) Svoji roli zde hrají i nozokomiální infekce související s dlouhodobě zavedenými centrálními katetry.

3.3.5. Nozokomiální infekce

Nozokomiální infekce lze definovat jako infekce endogenního nebo exogenního původu, které vznikly v souvislosti s pobytem novorozence ve zdravotnickém zařízení. Jedním ze základních znaků nozokomiálních infekcí je role nemocničních kmenů, které jsou většinou dosti rezistentní na antibiotika a dezinfekční prostředky. Tyto infekce jsou v současnosti důležitou příčinou vzrůstající úmrtnosti novorozenců. (2)

Někdy je pro lékaře těžké rozhodnout, zda se jedná o pozdní infekce vyvolané mikroorganismy, se kterými se plod dostal do kontaktu v souvislosti s těhotenstvím a porodem, anebo jestli se nakazil až po porodu, tedy zda se jedná o přenos nozokomiální.

3.4. Nejčastější původci novorozenecké sepse

Obsahem této kapitoly jsou nejčastější původci novorozenecké sepse v MNUL v období 2011–2015.

3.4.1. Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou grampozitivní koky, uspořádané jednotlivě, ve dvojicích nebo shlucích, připomínající tvar hroznu. Jsou nepohyblivé a netvoří spory. Podle jejich schopnosti koagulovat plazmu se tento rod dále dělí na dvě skupiny: stafylokoky koagulázanegativní a koagulázapozitivní. (8)

3.4.1.1. Stafylokoky koagulázapozitivní

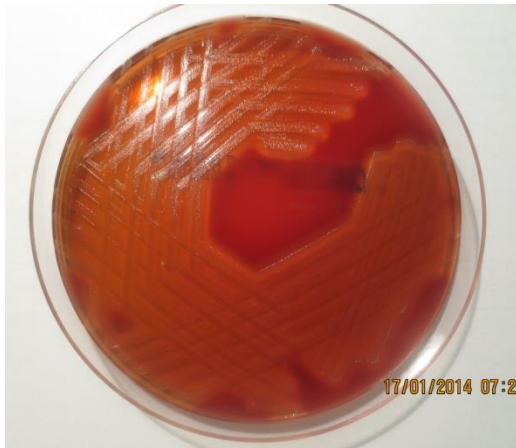
Staphylococcus aureus

Jedná se o nejdůležitější lidský patogen v této skupině. Na virulenci kmenů se podílí řada extracelulárně produkovaných látek, např. koaguláza, fibrinolysin, enterotoxin, hyalurinidáza, β -laktamáza a proteolytických enzymů, jako jsou nukleázy, proteázy, fosfatázy. Infekce vyvolané tímto kmenem mají sklon k recidivám a chronickému průběhu. (5)

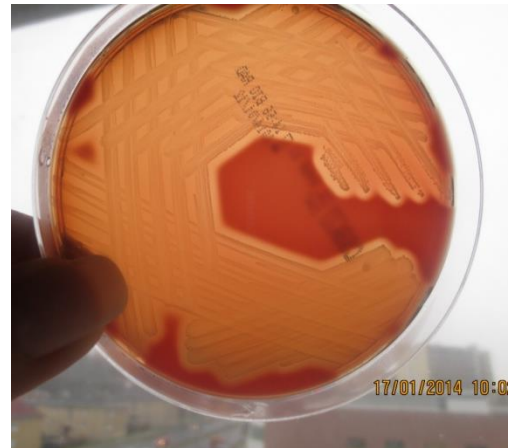
Jde o mikroba rezistentního k zevnímu prostředí, který roste na běžných laboratorních půdách při 37 °C za 24 hodin. Na selektivních půdách je schopen se množit v přítomnosti 10% NaCl. Na neselektivních půdách jsou jeho kolonie velké, neprůhledné, hladké a pigmentované. (8)

Asi třetina lidí je nosičem tohoto kmene, aniž by měla nějaké příznaky. Způsobuje hnisavé onemocnění ran při povrchových zraněních, popáleninách nebo operačních ranách. U novorozenců se jedná o stafylokokové sepse, pneumonie, konjunktivitidy, otitidy, meningitidy a další onemocnění. (5)

Během sledovaného období 2011–2015 bylo nalezeno 26 kmenů *Staphylococcus aureus*, způsobujících sepsi.



Obrázek 1 - *Staphylococcus aureus* (foto: Šárka Baláčková)



Obrázek 2 - *Staphylococcus aureus* s viditelnou hemolýzou (foto: Šárka Baláčková)

3.4.1.2. Stafylokoky koagulázanegativní

Jsou součástí běžné lidské mikroflóry sliznic a kůže. Dnes se uplatňují jako oportunní patogeny. Nejdůležitějšími druhy jsou *Staphylococcus epidermidis*, méně se vyskytují *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warnerii*, *Staphylococcus saprophyticus*, a další druhy. (8)

Tyto mikroby se vyznačují zvýšenou afinitou ke kolonizaci cizorodých materiálů. Schopnost produkce mukoidní polysacharidové substance je hlavním faktorem jejich adhezivity. Mukoidní povlak totiž chrání bakteriální kolonii před působením antibiotik, protilátek a fagocytů. (5)

Stafylokoky koagulázanegativní rostou na běžných půdách v koloniích různě velikých podle druhu. Některé kolonie mají pigment. Řada druhů tvoří hemolýziny. Druhá identifikace koagulázanegativních stafylokoků je založena na různých biochemických znacích. Důležité je např. štěpení močoviny, mannitolu, sacharózy a tvorba acetoinu a glukosidázy. Kombinace těchto a dalších testů je základem komerčních souprav k identifikaci stafylokoků. (8)

Tyto kmeny vyvolávají nejčastěji těžké infekce a septikémie související s dlouhodobě zavedenými centrálními katetry.

V letech 2011–2015 bylo zachyceno v MNUL 801 koagulázanegativních stafylokoků, což činí až 76,5 % z celkového počtu původců novorozenecké sepsy.

3.4.2. Rod *Streptococcus*

Jedná se o grampozitivní koky, nejčastěji uspořádané jako diplokoky nebo řetízky. Jsou součástí běžné flóry, ale mohou se stát i potenciálními patogeny. Klasifikace se provádí na základě hemolýzy na krevním agaru nebo přítomností povrchového antigenu. Serologické třídění je podle C-polysacharidu v buněčné stěně streptokoka (skupina A–U). Nejzajímavější jsou skupiny A (*Streptococcus pyogenes*) a B (*Streptococcus agalactiae*). (9)

Podle změn na krevním agaru rozeznáváme:

- *streptokoky α -hemolytické - viridující*: kolem kolonií se vytváří hnědozelené zbarvení
- *streptokoky β -hemolytické*: rozrušují membránu erytrocytů, kolonie jsou obklopeny hemolýzou
- *streptokoky nehemolytické*: agar nemění (5)

Virulence a patogeneze je způsobená přítomností kyseliny hyaluronové, která imituje pojivovou tkáň a brání fagocytóze. Dále to jsou fimbrie, které nalezneme ukotvené v buněčné membráně a toxické enzymy a toxiny. (9)

Laboratorní diagnostika β -hemolytických streptokoků se provádí pomocí bacitracinového testu a CAMP-testu.

Streptococcus agalactiae

Patří do skupiny β -hemolytických streptokoků skupiny B. Na krevním agaru vyrůstá v koloniích mnohem větších než *Streptococcus pyogenes*, mazlavých, obklopených úzkou zónou, neúplné β -hemolýzy. (8)

Je nejdůležitější původce novorozeneckých meningitid a sepsí. Podle klinických projevů infekce způsobuje časnou nebo pozdní formu onemocnění u novorozenců. Zvýšené riziko pro vznik infekce novorozenců představuje rovněž nízká hladina typově specifických mateřských protilátek proti jednotlivým sérotypům skupiny B. (5)

Spektrum onemocnění zahrnuje bakteriemii, pneumonii, meningitidu a septický šok. Ještě před 100 lety mívalo onemocnění způsobené touto bakterií vysokou úmrtnost a vyskytovalo se jako poporodní sepse (*sepsis puerperalis*, horečka omladnic). (8)

Velmi pozdní forma onemocnění se objevuje u nedonošených novorozenců s dlouhodobou hospitalizací. Streptokoky skupiny B jsou i významnými původci komplikací v šestinedělí (endometritidy, bakteriémie po císařském řezu). (8)

Screening těhotných žen významně přispívá ke snížení onemocnění způsobeného touto bakterií jak u novorozenců tak samotných žen. V naší nemocnici byly zachyceny pouze čtyři případy sepse vyvolané bakterií *Streptococcus agalactiae*.

3.4.3. Rod *Enterococcus*

Jedná se o podmíněné patogeny. Podle vlastností se rozlišuje několik druhů, pro člověka jsou důležité *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*.

Mikroskopicky se jedná o grampozitivní, oválné až lehce protáhlé koky. Jsou uspořádané ve dvojicích, drobných shlucích nebo krátkých řetězcích. Kultivačně jsou nenáročné, na krevním agaru rostou v drobných šedobílých koloniích, často se zónou viridace, výjimečně s β -hemolýzou. Pro záchyt může být použita selektivně diagnostická půda Slanetzova-Bartleyho, která obsahuje azid sodný, trifenylnitroimidazoliumchlorid a glukosu. Enterokoky zde vyrůstají v růžových koloniích. (8)

Jsou hlavními původci onemocnění močových cest, ale nalezneme je i u infekcí ran a nitrobršních zánětů. Způsobují těžké sepse a meningitidy u novorozenců. (8)

Během sledovaného období bylo v MNUL 31 nálezů v pozitivních hemokulturách.

3.4.4. Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky

Tato skupiny zahrnuje celou škálu rodů. Mezi nejvýznamnější původce novorozenecké sepse patří rody *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* a *Haemophilus*. Společně tvoří čeleď zvanou *Enterobacteriaceae*. Zmíním jen ty rody, které byly zachyceny nejčastěji během sledovaného období mé práce.

Escherichia coli

Jedná se o nejznámějšího podmíněného patogena, který je běžně součástí lidské mikroflóry u zdravých lidí. Je komenzálem, částečně saprofytem a také symbiontem. Podílí se na tvorbě některých vitamínů, především vitamínu K. (8)

Kultivace se provádí na běžných půdách. Na Endově půdě vytváří charakteristické kolonie purpurového vzhledu a jejich okolí, a fermentují laktózu. *Escherichia coli* se typizuje podle somatických O-antigenů a kapsulárních K-antigenů. Některé sérotypy tvoří toxické produkty nebo vykazují zvýšenou invazivitu vůči střevní sliznici. Tyto kmeny pak vyvolávají i život ohrožující onemocnění. (10)

Escherichia coli je nejčastěji původcem uroinfekcí. Závažné jsou novorozenecké meningitidy a sepse. Zvýšenému riziku infekce jsou pak vystaveni novorozenci s endotracheální intubací nebo s centrálními katetry. (5)

Escherichia coli může být zdrojem i nozokomiální infekce. Během sledované období patřila tato bakterie k druhému nejčastějšímu původci novorozenecké sepse a to v počtu 56 záchytů.



Obrázek 3 - *Escherichia coli* (foto: Šárka Baláčková)

Rod *Klebsiella*

Vyskytuje se běžně v zažívacím traktu, vodě a v prostředí kolem nás. Snadno proniká do tělních dutin, kde způsobuje závažná onemocnění. Poslední roky je důležitým původcem nozokomiálních nákaz.

Kultivačně se jedná o nenáročné bakterie, rostoucí na běžných půdách ve větších koloniích a může tvořit pouzdra, což způsobuje jejich mukózní vzhled. Existuje několik druhů, z nichž nejznámější je *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca*. (11)

Klebsiella patří mezi původce onemocnění dýchacích cest, uroinfekcí a sepsí. Zde se uplatňuje zejména při nozokomiálních infekcích. Počet záchytů byl 26.

Mezi další rody, které byly zachyceny během sledovaného období, patří rod *Proteus* s jedním záchytem a rod *Enterobacter* se 7 záchyty. Co se týče dalších mikroorganismů, které mohou způsobit sepsi u novorozence, jako jsou rody *Haemophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, zde nebyl zaznamenán ve sledovaném období žádný záchyt.



Obrázek 4 - *Haemophilus influenzae* (foto: Šárka Baláčková)

3.4.5. Anaerobní bakterie

Jde o velkou skupinu, která zahrnuje mnoho rodů. Rod *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* a *Bifidobacterium*. Zmínila jsem jen ty, které se podařilo zachytit během sledovaného období v pozitivních hemokulturách odebraných na novorozeneckém oddělení. Onemocnění způsobená těmito bakteriemi jsou různorodá od závažných hnisavých infekcí ran, endokarditid až po sepsi.

Anaerobní bakterie jsou součástí běžné mikroflóry člověka. Produkují řadu invazivních faktorů a toxinů a to jim dovoluje při oslabení organismu pronikat za fyziologickou bariéru a vyvolat těžké onemocnění. Většina z nich tvoří spóry a proto vykazují velkou odolnost k extrémním podmínkám. Faktorů virulence a patogenity je mnoho a záleží na příslušném rodu. Jsou to např. hydrolytické enzymy, proteázy, hyaluronidázy, enterotoxiny.

Mikroskopicky mohou být grampozitivní nebo gramnegativní, záleží na rodu. Společné pro tyto bakterie je, že k růstu vyžadují přítomnost kyslíku ve velmi nízké

koncentraci a pro některé je přítomnost kyslíku toxická. Laboratorní diagnostika se opírá o mikroskopii, kultivaci a biochemické vlastnosti. Doba kultivace je 48 hodin při 37 °C v anaerostatu. Pro kultivaci se používá obohacená půda Schaedlerův agar. Jedná se o obohacenou půdu o růstové faktory, jako je např. hemin, kvasničný extrakt, vitamín K. Obsahuje redukující látky cystein a glukózu. (11)

Celkový počet zachycených anaerobních bakterií v letech 2011–2015 byl 48 druhů. Nejvíce byl zastoupen rod *Bacteroides species* (20 záchytů), *Peptostreptococcus anaerobius* (5), *Bacteroides fragilis* (3), *Lactobacillus species* (3), *Peptostreptococcus species* (3), *Prevotella species* (3), *Propionibacterium acnes* (3), *Bifidobacterium species* (2), *Propionibacterium species* (2), *Actinomyces species* (1), *Clostridium species* (1) a *Eubacterium aerogenes* (2).

3.4.6. Kvasinky

Spektrum druhů kvasinek, které mohou způsobit infekci, je dosti široké. Identifikace kvasinek proto není snadná. Rod *Candida* se vyskytuje v klinickém materiálu nejčastěji, proto je nejvýznamnější. K původcům lidských infekcí patří především druhy *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida crusei*, *Candida tropicalis* a další. U většiny jedinců můžeme najít v malém počtu kvasinky jako součást zažívacího traktu, u dospělých žen v pochvě aniž by došlo k vyvolání infekce. Když dojde k oslabení organismu onemocněním, vzniká kvasinková infekce.

Mortalita invazivních infekcí vyvolaných kvasinkami je 30–40 %, pokud se terapie zahájí později než 12 hodin od vzniku infekce. (9)

Nález kvasinek, jako původců novorozenecké sepse v období 2011–2015, byl pouze 7 záchytů.

Candida albicans

Podle charakteru prostředí tvoří morfologicky blastokonie, hyfy, pseudohyfy, chlamydokonie a zárodečné klíčky. Tyto útvary se liší tvarově, barví se grampozitivně. Faktorem virulence jsou hlavně: termální dimorfismus, produkce ureázy, proteázy, adheze k anorganickým a organickým povrchům. (10)

Kultivačně je nenáročná, dobře roste při 28–30 °C, vyroste za 24 hodin. Na krevním agaru tvoří drobné kolonie s typickou vůní chleba. Na Sabouraudově agaru

s 4% glukózou roste ve velkých, krémových, neprůhledných koloniích, matného povrchu s typickou vůní chleba. (10)

Onemocnění může mít podobu od kožních a slizničních kandidóz, až po infekce dýchacích cest, trávicího traktu, urogenitálního systému až po závažné endokarditidy a sepse. Kandidová sepse nejvíce ohrožuje extrémně nedonošené novorozence. (8)

3.5. Terapie

Terapie novorozeneckých sepsí je komplexní a zahrnuje léčbu kauzální, tedy anti-mikrobiální, a podpůrnou, jejímž úkolem je stabilizace klinického stavu dítěte, dále terapii komplikací spojených se sepsí a podporu imunitních funkcí. (7)

3.5.1. Kauzální terapie

Výběr vhodného antibiotika vychází velmi často z určitého předpokladu možného nejpravděpodobnějšího vyvolávajícího agens. Jiné to je v případě časně sepse, pozdní sepse či nozokomiální nákazy. V léčbě časně formy sepse se nejčastěji používá kombinace ampicilinu s gentamicinem, tato širokospektrá antibiotická kombinace pokrývá nejčastější původce. Pozdní forma sepse je často spojená s nozokomiální bakteriální flórou. Výběr antibiotika zde vychází ze znalosti spektra bakterií konkrétního oddělení a jejich citlivosti. (7)

Podpůrná terapie představuje důležitou součást léčby novorozenecké sepse, kterou není možno opomíjet. Napomáhá ke stabilizaci klinického stavu dítěte léčbou komplikací, které sepsi provázejí. Součástí podpůrné léčby jsou především parenterální výživa nezbytná k dostatečnému přívodu tekutin a základních živin, ventilační podpora a oběhová podpora k podpoře krevního tlaku, hematologická terapie. Imunologická terapie se provádí podáváním imunoglobulinů. (7)

Antibiotika se novorozencům podávají intravenózně. Léčbu zahajujeme při podezření na sepsi a při pozitivním nálezů zánětlivých markerů. Doba podávání antibiotik se omezuje jen na nezbytně nutnou dobu dle patogena způsobujícího sepsi.

Dlouhodobé neopodstatněné podávání antibiotik jednoznačně zvyšuje riziko výskytu rezistentních bakteriálních kmenů. (7)

3.6. Faktory ovlivňující výsledek vyšetření infekcí krevního řečiště

3.6.1. Místo odběru vzorku

Velmi důležité pro vyšetření je způsob odběru vzorku, místo odběru, objem krve pro kultivaci a počet odebraných hemokultur. Všechny tyto aspekty zásadním způsobem ovlivňují výsledek vyšetření a zvyšují úspěšný záchyt bakterií.

K rutinním diagnostickým metodám při vyšetření septického stavu patří vyšetření hemokultury. Jedná se o odebranou krev do odběrové nádoby s kultivačním médiem. Dochází zde k pomnožení mikroba, následně je provedena identifikace a citlivost na antimikrobiální látky. Pro kultivaci lze odebrat různé druhy krve.

- *Venózní krev*: Jedná se o nejběžnější způsob odběru. Odebírá se z periferní žíly. Vzhledem k častějšímu využívání stálých žilních vstupů se nedoporučuje tyto vstupy používat pro odběr hemokultury. Hrozí zde riziko kontaminace.
- *Arteriální krev*: Krev se nejčastěji odebírá z povrchových žil končetin nebo z povrchových žil nad lebečními kostmi. U novorozenců se mohou použít žíly v temporální oblasti.
- *Pupečnicková krev*: Jde o krev, která se daleko lépe získává od novorozenců než venózní krev. Její odběr se v současnosti nedoporučuje pro velké riziko kontaminace. (2)

3.6.2. Doba odběru vzorku

Optimální čas pro odběr krve na hemokultivaci je velmi důležitý pro úspěšné zachycení bakterií.

Odběry vzorků se provádí před zahájením antibiotické léčby. Frekvence samotného odběru pro hemokultivaci se řídí charakterem klinického obrazu pacienta a teplotní křivky.

Optimální je odběr minimálně dvakrát během septické epizody a to vždy po dvou lahvičkách na hemokultivaci. Krev se odebírá asepticky do hemokultivačních lahviček pro kultivaci aerobní a anaerobní. U novorozenců se odebírá jedna aerobní nebo speciální pediatrická lahvička. V MNUL se odebírá u novorozenců i hemokultivační lahvička pro anaerobní kultivaci. K vyplavení bakterií do krevního řečiště dochází dvěma způsoby:

- *Kontinuální vyplavování:* V krvi je trvale přítomna hladina bakterií, kterou je možno zachytit. Tento stav je spojen s těžkým poškozením obranyschopnosti organismu. Pro diagnostiku sepse je nejuhodnější.
- *Intermitentní vyplavování:* Zde dochází k vyplavování bakterií v určitém časovém intervalu. Většinou při objevení třesavky a vzestupu teploty. (2)

3.6.3. Objem a odběr vzorku

Při odběru krve na hemokultivaci je potřeba dodržovat postupy a techniky, které jsou v souladu s laboratorními zásadami. Důležité je dbát, aby nedošlo ke kontaminaci a tím k falešné pozitivitě vzorku. Před samotným odběrem je potřeba nechat hemokultivační lahvičky vytemperovat na pokojovou teplotu. Pro odběr je potřeba si uvědomit zásady správné dezinfekce kůže. A proto se současně s odběrem provádí i stěr z kůže v místě vpichu, který nám slouží k posouzení případné kontaminace hemokultury mikroflórou. Běžně se u dospělého člověka odebírá minimálně 5 ml na jednu lahvičku, maximum je až 10 ml. U novorozenců se při jednom odběru odebírá 1–2 ml, u větších dětí 3–5 ml krve. Každý výrobce hemokultivačních lahviček udává svoje instrukce o objemu krve potřebného do hemokultivační lahvičky. (3)

Klinická data pro přístroj VersaTREK/ESP kultivační systém II doporučují odběr 1–5 ml u dospělých pacientů a u pediatrických 0,1–3 ml krve.

Septum lahviček se dezinfikuje metanolem, etanolem nebo jiným dezinfekčním přípravkem. Ponechá se před vlastní inokulací lahviček zaschnout. Nedoporučuje se používat dezinfekční prostředky na bázi jódu pro dezinfekci komerčních hemokultivačních systémů. Tyto přípravky poškozují svým chemickým složením gumové septum lahvičky. Lahvička musí být vždy řádně označená. Důležité je i správné vyplnění žádanky o vyšetření. Jedná se hlavně o údaje týkající se předchozí léčby, druhu a doby trvání.

3.6.4. Transport a skladování hemokultur

Odebrané hemokultury by měly být transportovány do laboratoře co nejdříve po odběru a vloženy do hemokultivačního systému nebo být inkubovány. Mikroorganismy přítomné v hemokultuře se totiž začínají množit ihned po odběru. Pokud není možný transport hned, je potřeba uchovávat lahvičky při pokojové teplotě. Nikdy nesmí být po odběru skladovány v lednici.

3.7. Hemokultivační systémy

3.7.1. Historie kultivačního průkazu bakterií

Pro mikrobiologický průkaz původců infekcí krevního řečiště se v praxi využívají metody přímé. V průběhu dějin prodělaly veliký vývoj. Během posledních let se ustálily na standartu hemokultivací. (2)

Prvním způsobem kultivace krve bylo využití krve jako kultivačního média (kultivace krevního koláče). Tato metoda se používala dlouho. Většina bakterií byla uzavřena uvnitř krevního koláče. Jejich růst byl pomalý a snadno přehlédnutelný. Později se začala krev kultivovat v nádobkách s tekutou kultivační půdou v tzv. Patočkových nádobách. Do sedmdesátých let minulého století si mikrobiologické laboratoře vyráběly hemokultivační lahvičky sami. Zvláštní transportní varianta hemokultivace, která se na našem území používala v sedmdesátých a osmdesátých letech, byl Hemotest I a Hemotest D. Postupně ale docházelo k nahrazování komerčními výrobky od firem zabývajících se výrobou mikrobiologických diagnostik. Manuální hemokultivační systémy představovaly kombinace aerobní a anaerobní lahvičky. (2)

Až s rozvojem počítačů a mikroelektroniky došlo k vývoji poloautomatických hemokultivačních systémů. Firma Becton Dickinson se systémy BACTEC byla průkopníkem v tomto vývoji. Zde bylo jako principu využito průkazu oxidu uhličitého radiometrickou metodou. Druhou firmou, která se výrazně podílela na vývoji hemokultivace je Organon Teknika. Tato firma použila jako princip stanovení oxidu uhličitého pomocí senzoru umístěného v hemokultivační lahvičce. Přístroje, které pracují na tomto principu, ovládly mikrobiologickou diagnostiku vyšetření sepsy a používají se do dnešní doby. (2)

3.7.2. Hemokultivační systémy

Principem detekce bakterií vyvolávajících sepsi je jejich kultivace a pomnožení do takového množství, aby byly viditelně prokazatelné jevy způsobené jejich růstem. Systémy můžeme dělit podle stupně automatizace, způsobu kultivace a detekčního mechanismu. (2)

Manuální kultivaci v dnešní době nahradily automatizované hemokultivační systémy. Automatizovaných hemokultivačních systémů je celá řada. Zmíním okrajově jen některé a blíže se budu věnovat systému BacT/Alert 3D a systému VersaTREK/ESP

kultivační systém II. S těmito systémy jsem měla možnost se seznámit během své praxe v laboratoři OKM v MNUL.

3.7.3. Manuální hemokultivační systémy

3.7.3.1. Klasická hemokultura

Jedná se o skleněnou nádobu uzavřenou šroubovacím gumovým uzávěrem. Inokulace se provádí propichováním gumového uzávěru. Tyto hemokultivační nádoby se připravovaly přímo v laboratořích. Jako kultivační médium se používá například tekutá půda brain heart infusion (mozko-srdcový výtažek). Doba kultivace se pohybuje od 1 až do 5 dnů při teplotě 37 °C. Tyto lahvičky se vyočkovávají na pevné kultivační půdy, včetně mikroskopie. Častá manipulace sebou nese riziko kontaminace a vysoké náklady na vyšetření.

3.7.3.2. Dvoufázová hemokultura (Castagnedova)

Jde o kombinace dvou kultivačních médií, které se společně využívají ke kultivaci. Lahvičky obsahují tuhou kultivační půdu a zároveň i tekutý bujon. Kultivace zde probíhá jako v běžné hemokultivační lahvičce. V případě positivity rostou kolonie na stěně lahvičky a jsou viditelné pouhým okem. (2)

3.7.3.3. Hemokultura s detekčním systémem na základě tlaku plynu - Signal (Oxoid)

Růst bakterií zde probíhá pomocí tlaku plynu (CO₂) uzavřeného v hemokultivační lahvičce. Tento systém se skládá ze dvou částí. První část je standartní hemokultivační lahvička s gumovým septem. Druhá část je plastová průhledná nádobka, opatřená dlouhou injekční jehlou a uzavřená víčkem. V laboratoři se na lahvičku před zahájením kultivace nasadí plastová průhledná nádobka. Během kultivace rostoucí bakterie vytváří plyn. Plyn svým tlakem vytlačuje hemokultivační médium přes dutou jehlu do plastové průhledné nádobky. Detekce positivity je potom možná pouhým okem. Z této nádobky potom hemokultury vyočkujeme na kultivační půdy. Tento systém lze použít pro aerobní i anaerobní kultivaci. (2)

3.7.4. Automatizované hemokultivační systémy

Princip těchto systémů je založen na detekci změn, které způsobí bakterie svým růstem. Vysoká citlivost a nepřetržité měření zkracují dobu nutnou k detekci positivity.

Tyto systémy používají co nejbohatší médium, které je nutné k zachycení i velmi malých a náročných bakterií a zároveň je potřeba eliminovat nebo odstranit nežádoucí látky. Samotná manipulace musí snížit riziko kontaminace na minimum. Během svého vývoje se měnily principy vlastní detekce.

3.7.4.1. Otevřené systémy detekující radioaktivní CO₂

Kultivační médium obsažené v lahvičce obsahuje glukózu značenou radioaktivním uhlíkem ¹⁴C, která je metabolizována na radioaktivní CO₂. Pomocí jehly se odebírá z každé lahvičky vzorek plynu a měří se jeho radioaktivita. Při zjištění vysoké hladiny radioaktivity v lahvičce dojde k vyočkování. Takového principu používal přístroj BACTEC 225. (2)

3.7.4.2. Otevřené systémy detekující spektrofotometricky CO₂

Přístroje používaly principu infračervené spektrofotometrické detekce CO₂, vznikajícího metabolismem množících bakterií. Další manipulace s lahvičkami byla stejná jako u otevřeného systému detekujícího radioaktivní CO₂. Na tomto principu pracoval například přístroj BACTEC 660. (2)

3.7.4.3. Uzavřené systémy detekující spektrofotometricky CO₂

Jedná se o infračervenou spektrofotometrickou detekci CO₂ vznikajícího metabolismem množících se bakterií skrz sklo. Hemokultivační lahvičky vkládá do společné měřicí jednotky pohyblivé rameno. Zpracování pozitivních lahviček je identické s předchozími systémy. Příkladem je přístroj BioArgos. (2)

3.7.4.4. Kontinuálně monitorující hemokultivační systémy

Tyto systémy přinesly do diagnostiky septických stavů kvalitativní převrat. Společných znaků je hned několik:

- společná integrovaná kultivační, detekční a třepací jednotka

- manipulace s lahvičkou je omezena jen na vložení do přístroje a následného vytažení po detekci positivity nebo ukončení kultivace
- neinvazivní systém
- kontinuální měření v intervalech 10 až 25 minut zvyšující rychlost detekce (2)

3.7.4.5. Spektrofotometrická detekce CO₂ pomocí senzoru

Přístroje, které pracují na tomto principu, jsou: BacT/Alert 120, BacT/Alert 240, BacT/Alert 3D, MB/Bact, BACTEC 9120, BACTEC 9240. Blíže se budu věnovat přístroji BacT/Alert 3D, který byl používán na OKM v MNUL.

3.7.4.5.1. BacT/Alert 3D

Princip: Spektrofotometrická detekce CO₂, který vzniká při množení bakterií, pomocí senzoru na dně hemokultivační lahvičky. Kultivační půdy odděluje od senzoru propustná membrána pouze pro CO₂. Během mikrobiálního metabolismu difunduje CO₂ membránou do senzoru. Dochází ke snížení pH a změní se jeho barva. Lahvička je kultivována za stálého třepání v přístroji. Celý systém je řízen počítačovým programem, ten vyhodnocuje nárůst koncentrace CO₂ v čase. (2)

Světelný a zvukový signál upozorní na lahvičky, které přístroj vyhodnotil jako pozitivní. Kultivace zde probíhá předem definovanou dobu a to dle druhu patogena a typu lahvičky. Po uplynutí této doby jsou lahvičky vyhodnoceny jako negativní.

BacT/Alert 3D se skládá z kontrolního modulu s vestavěným řídicím počítačem. K modulu jsou připojeny inkubátory a každý z nich obsahuje 4 kultivační jednotky. Kontrolní modul se ovládá pomocí dotykového displeje. Vkládání hemokultivačních lahviček se provádí pomocí čárového kódu, který je umístěn na lahvičce. Výhodou tohoto systému je, že vylučuje kontaminaci a záměnu lahviček. Kontinuální měření ihned detekuje pozitivní lahvičku. Všechny tyto aspekty znamenají úsporu pracovních sil i financí.



Obrázek 5 - Přístroj Bact-ALERT 3D (foto: Šárka Baláčková)



Obrázek 6 - Odběrové lahvičky systému Bact/ALERT (foto: Šárka Baláčková)



Obrázek 7 - Přístroj Bact-ALERT 3D (foto: Šárka Baláčková)

3.7.4.6. Detekce positivity pomocí plynu

Přístroje založené na tomto principu detekují pomocí tlaku vyvíjeného nebo spotřebovaného plynu. Každá lahvička je opatřena adaptérem, jehož pomocí přístroj monitoruje tlak v prostoru hrdla lahvičky. (2)

Přístroje, které na tomto principu pracují, jsou VersaTREK/ESP kultivační systém II, Difco ESP. OKM v MNUL v současné době využívá pro kultivaci zmíněný přístroj VersaTREK/ESP kultivační systém II.

3.7.4.6.1. VersaTREK/ESP kultivační systém II

Hemokultivační systém využívá pro počáteční krok při mikrobiální izolaci bujónové médium, které je uvnitř lahvičky Redox 1 (aerobní kultivace) a Redox 2 (anaerobní kultivace). Spotřebu plynu O_2 anebo produkci plynu CO_2 , H_2 , N_2 přístroj detekuje jako růst mikroorganismu. K monitorování lahviček během kultivace se používá VersaTREK konektor, který vytváří sterilní monitorovací cestu mezi přístrojem a lahvičkou. Tento konektor se asepticky nasazuje na vršek lahvičky. Správná pozice VersaTREK konektoru zajišťuje propojení s přístrojem. Lahvička se vloží do přístroje buď k aerobní kultivaci, anebo anaerobní kultivaci pomocí čárového kódu umístěného na lahvičce. Přístroj VersaTREK/ESP kultivační systém II detekuje mikrobiální růst kontinuálním monitorováním spotřeby nebo tvorby plynu přes detektor a hlásí růstovou odezvu (positivitu). Lahvička se vyjme z přístroje, odstraní se konektor, vydezinfikuje se hrdlo lahvičky a vyočkuje se obsah na kultivační půdy. (12)



Obrázek 8 - Příklad přístroje VersaTREK/ESP kultivačního systému (foto: Šárka Baláčková)



Obrázek 9 - Příklad přístroje VersaTREK/ESP kultivačního systému s otevřeným boxem (foto: Šárka Baláčková)



Obrázek 10 - Odběrové lahvičky VersaTREK REDOX 1 a REDOX 2 (foto: Šárka Baláčková)



Obrázek 11 - Odběrové lahvičky VersaTREK REDOX 1 a REDOX 2 s nasazeným konusem (foto: Šárka Baláčková)

4. Praktická část

4.1. Zpracování hemokultur a kultivační průkaz bakterií

OKM v MNUL v současné době používá pro detekci patogenů vyvolávající sepsi automatizovaný hemokultivační systém VersaTREK/ESP kultivační systém II, který nahradil přístroj BacT/Alert 3D.

Při příjmu hemokultivačních lahvíček Redox 1 (aerobní kultivace) a Redox 2 (anaerobní kultivace) do laboratoře dojde ke kontrole identifikačních údajů na hemokultuře s průvodním listem. Při shodě dostane vzorek laboratorní číslo a je zapsán do laboratorního informačního systému. Před samotným vložením hemokultury do přístroje je potřeba provést dezinfekci gumového septa a nasadit na lahvičku konektor. Konektor slouží k vytvoření sterilní monitorovací cesty mezi lahvičkou inkubovanou v přístroji a samotným přístrojem VersaTREK/ESP kultivační systém II. Pomocí čárového kódu, který je součástí každé lahvičky, vkládáme lahvičky do přístroje a laboratorní číslo zadáváme pomocí dotykové obrazovky. Aerobní lahvička se během kultivace automaticky třepe a tím dosahuje optimálních podmínek pro kultivaci. Anaerobní kultivace probíhá za stabilních podmínek. Kultivace všech hemokultur probíhá 5 dní.

Pozitivní lahvičky přístroj hlásí stabilním červeným světlem a zvukovým signálem. Pozitivní lahvičku vyjmeme z přístroje. Nikdy hemokultivační lahvičku nenaklápíme ani nepřevracíme. Sundáme konektor z lahvičky a vyočkujeme krev na kultivační půdy včetně mikroskopie.

4.1.1. Mikroskopie

Provádí se u pozitivních hemokultur. Septum hemokultury se vydezinfikuje vhodným dezinfekčním prostředkem a nechá se zaschnout. Pomocí odvzdušňovací jehly odebereme pár kapek vzorku a provedeme nátěr na mikroskopické sklíčko. Po zaschnutí a fixaci provedeme diagnostické barvení dle Grama.

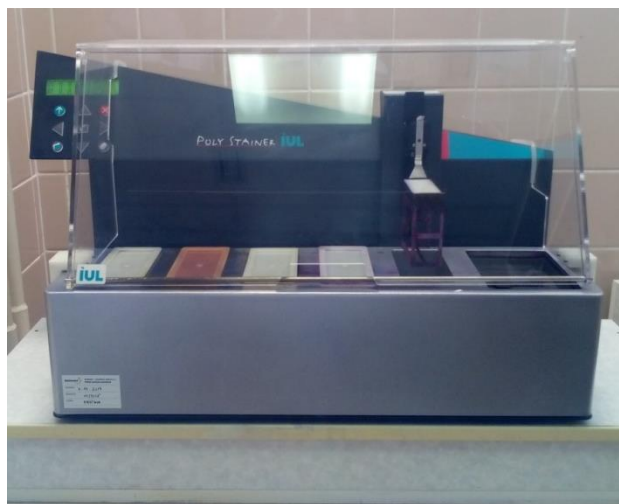
Gramovo barvení patří mezi nejdůležitější barvení v mikrobiologii. Umožňuje zjištění tvaru, uspořádání a další vlastnosti mikrobů. Podstata barvení spočívá v rozdílné barvitelnosti bakterií, která je dána stavbou buněčné stěny. Barvení rozděluje bakterie dvou základních taxonomických skupin na grampozitivní a gramnegativní. Občas se lze setkat i s útvary, které se jeví jako gramlabilní.

Pro barvení používá OKM v MNUL barvicí automat Poly Stainer. Jedná se o barvicí automat, který obarví najednou až 20 mikroskopických sklíček. Preparáty se vloží do košíčku umístěného na pohyblivém rameni. Celý barvicí proces je naprogramován a probíhá sám bez účasti laborantky. Doba barvení se zde pohybuje okolo 15 minut.

K barvení je zapotřebí: Krystalová violet', aceton, Lugolův roztok, Karbolfuchsin, voda.

Postup barvení:

1. Fixace preparátu
2. Krystalová violet' 20 sekund
3. Lugolův roztok 20 sekund
4. oplach acetonem
5. oplach vodou
6. Karbolfuchsin 1 minuta
7. oplach vodou
8. sušení preparátu



Obrázek 12 - Barvicí automat Poly Stainer (foto: Šárka Baláčková)

Prohlížení preparátu:

Pro mikroskopické hodnocení se používá optický mikroskop za použití imerzního systému při zvětšení 1000x. Imerzní roztoky jsou připravovány s indexem lomu blízkým hodnotám skla. Snižují ztrátu světla, ke kterým dochází při přechodu paprsků z prostředí opticky hustšího (sklo) do prostředí opticky řidšího (vzduch). (13) Pomocí tohoto systému je obraz jasný a kontrastní.

Hodnocení:

Grampozitivní bakterie se barví tmavě modře, gramnegativní bakterie červeně.

4.1.2. Kultivace a kultivační půdy

Pro zpracování pozitivních hemokultur OKM v MNUL používá tyto půdy:

4.1.2.1. Krevní agar

Připravuje se z 5% sterilní defibrinované beraní krve, která se přidává do agarového základu zchlazeného na 50 °C. Půda je obohacená o speciální směs peptonů. Přítomnost krve umožňuje prokázat hemolytické reakce určitých bakterií. Na krevním agaru roste většina patogenních grampozitivních i gramnegativních bakterií. Sledujeme, zda bakterie tvoří hemolýzu. Doba kultivace je 24 hodin při 37 °C, pokud možno v mikroaerofilní nebo aerobní atmosféře.

4.1.2.2. MacConkeyho agar

Jedná se o půdu, která je podobná funkčně i vzhledem Endově půdě. Obsahuje laktózu, neutrální červeň, krystalovou violet' a žlučové soli. Selektivita půdy je založená na kombinaci účinků žlučových solí (inhibice neenterických bakterií) a krystalové violeti (inhibice grampozitivních bakterií). Diferenciace *Enterobacteriaceae* je založena na jejich schopnosti fermentovat laktózu, což navozuje okyselení a projeví se zčervenáním kolonií. Laktóza pozitivní bakterie tvoří růžové kolonie, které mají někdy okolo sebe růžový precipitát (vysrážené žlučové soli). Nefermentující bakterie tvoří bezbarvé kolonie. Doba kultivace je 24 hodin při 37 °C, v aerobní atmosféře.

4.1.2.3. Sabouraudův agar

Obsahuje 2–4 % glukózy nebo maltózy, vhodná antibiotika pro potlačení růstu bakterií (chloramphenicol, gentamicin), cykloheximid. Tato půda je určena pro růst kvasinek a plísní. Její nízké pH je vhodné pro růst plísní, zejména dermatofytů a inhibuje doprovodnou bakteriální flóru. Cukry poskytují potřebný zdroj energie, antibiotika širokou inhibici bakterií. Cykloheximid je protiplísňové činidlo, které je primárně aktivní proti saprofytickým plísním a neinhibuje patogenní druhy. Kultivace se pohybuje okolo 1 až 5 dní při 27 °C a 37 °C.

4.1.2.4. Schaedlerův agar

Izolační médium vhodné pro kultivaci anaerobních mikroorganismů. Jedná se o obohacenou půdu o růstové faktory, jako je např. hemin, kvasničný extrakt, vitamín K. Obsahuje redukující látky cystein a glukózu. Doba kultivace je 48 hodin při 37 °C v anaerostatu.

4.1.2.5. Mueller–Hinton agar

Jde o pevnou kultivační půdu pro testování antimikrobiální citlivosti metodou difúzního diskového testu v agaru. Půda obsahuje agar, Kaseinový hydrolyzát a definované koncentrace chloridu vápenatého, chloridu hořečnatého, chloridu zinečnatého. Doba kultivace je 24 hodin při 37 °C, v aerobní atmosféře.

4.1.3. Zpracování pozitivních hemokultur

Po vyjmutí pozitivní hemokultury z přístroje odstraníme konektor. Hrdlo hemokultivační lahvičky vydezinfikujeme, sterilně nasadíme odvodušňovací adaptér. Na každou kultivační půdu kápneme kapku krve z hemokultivační lahvičky. Očkujeme krevní agar, MacConkeyho půdu, Sabouraudův agar 2x (kultivace při různých teplotách). Pokud se jedná o anaerobní lahvičku, přidáváme Schaedlerův agar pro záchyt anaerobních bakterií. Půdy rozočkujeme pomocí laboratorních kliček a dáme kultivovat do termostatu. Po uplynutí kultivační doby provedeme odečet kultivační půdy, následně identifikaci patogena a stanovení citlivosti na antibiotika.

4.1.4. Identifikace bakterií

Základní podmínkou, pro provedení jakéhokoliv identifikačního postupu, je mít k dispozici patogena v čisté kultuře.

OKM v MNUL používá k identifikaci mikroorganismů metodu hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Hmotnostní spektrometrie je řešení pro rychlou a spolehlivou identifikaci bakterií, plísní a kvasinek.

4.1.4.1. MALDI-TOF

Princip: Laser ozáří nanosekundovým pulsem směs vzorku a matrice, přičemž matrice absorbuje energii pulsu a její rozklad ionizuje molekulu vzorku, především

ve vysokých koncentracích přítomné ribosomální proteiny. Pozitivně nabitě ionty jsou pak na krátkou vzdálenost urychleny silným elektrickým polem a vstupují do vakua v trubici detektoru, kde se pohybují rychlostí úměrnou jejich hmotnosti a náboji. Doba letu se přesně měří a výpočetně se konvertuje na poměr molekulové hmotnosti a náboje.

(14)

Postup: Pro provedení analýzy je potřeba mít vždy čerstvě namnoženou kulturu stanovovaného vzorku. Vzorek pro identifikaci nanese se na terčík ocelové destičky pomocí párátko. Po zaschnutí je ošetřen aplikací MALDI matrice (α -kyano-4-hydroxykyselinová kyselina). Destičku po zaschnutí MALDI matrice vložíme do přístroje. Počkáme na vytvoření vakua a spustíme vlastní měření.

Kolonie mikroorganismu je pak druhově identifikována porovnáním jejího hmotnostního spektra s databází obsahující tisíce referenčních molekulárních identifikátorů, získaných pro jednotlivé referenční kmeny mikroorganismů. Výstupem provedené identifikace je druhová identifikace mikroorganismů s přiřazenou hodnotou skóre. Identifikaci můžeme také provést po čtyř hodinové inkubaci naočkovaného krevního agaru (krev z hemokultury se pouze nakape na plotnu, nerozočkovává se), kdy je už na plotně zřetelný nárůst bakterie. Stanovení přístrojem MALDI-TOF je tak citlivé, že stačí malé množství vzorku. Přístroj také umožňuje identifikaci patogenů přímo z biologického materiálu nebo pozitivní hemokultury. Zde je ale potřeba provést extrakci kyselinou mravenčí, nebo pomocí TFA (kyselina trifluoroctová), která je vhodná pro inaktivaci biologického materiálu a odstranění balastů rušících samotnou identifikaci. Tento postup je časově více náročný a ne vždy přinese očekávaný výsledek. Vlastní interpretaci výsledků provádí vždy mikrobiolog.



**Obrázek 13 - Hmotnostní spektrometr IVD
MALDI Biotyper Systém (foto: Šárka Baláčková)**

4.1.5. Stanovení citlivosti na antibiotika

Citlivost na antibiotika můžeme stanovovat buď diskovou difúzní metodou (kvalitativní test) nebo diluční metodou v mikrodestičkách (kvantitativní test). Difúzní diskový test je nejrozšířenější a je vhodný pro rutinní vyšetřování bakterií. Umožňuje jednoduchým způsobem hodnotit citlivost pro větší počet mikrobů a antibiotik. Pro testování používáme Mueller-Hinton agar bez krve a Mueller-Hinton agar s krví (pro náročné bakterie). Diluční metoda v mikrodestičkách je náročnější. Používají se komerčně vyrobené destičky s řadou antibiotik v odstupňovaných koncentracích. Pro kvantitativní stanovení lze také použít přístroj VITEK 2 Compact 30.

4.1.5.1. Disková difúzní metoda

Provádí se z narostlé kultury na kultivační půdě. Kličkou připravíme inokulum 2–5 kolonií kultury ve fyziologickém roztoku o zákalu 0,5 McFarlandova zákalového standardu. Suspenze se naočkuje suchým sterilním tampónem roztěrem rovnoměrně po povrchu Mueller-Hinton půdy ve třech různých směrech. Pro nanášení suspenze

může být použit i způsob přelévání ploten, zde je dosaženo rovnoměrného růstu mikroba na agaru. Po zaschnutí se aplikují antibiotické disky pomocí sterilní injekční jehly nebo otiskem dispensoru. Aplikace disků by měla být do 15 minut od naočkování. Na jednu plotnu o poloměru 90 mm by se nemělo pokládat více než 7 disků. Antibiotické disky difundují do půdy ihned, a proto se už nesmí na půdě přemisťovat. Inkubace je 18 až 20 hodin při 37 °C. Po inkubaci měříme průměr inhibičních zón v milimetrech jednotlivých testovaných antibiotik.

Pro hodnocení inhibičních zón antibiotik využívá OKM v MNUL poloautomatický odečítač inhibičních zón antibiotik - přístroj VISOR 2. Jedná se o poloautomat pro dokumentaci a hodnocení vizuálních mikrobiologických metod. Práci na tomto přístroji můžeme rozdělit do dvou fází. V první fázi dojde k pořízení snímku plotny digitální kamerou, která se vkládá do mechanismu otočného karuselu přístroje. Focení jedné plotny trvá asi 2 sekundy. Součástí přístroje není jen modul pořizování snímků, ale i analytický modul zahrnující identifikaci a měření inhibičních zón, sledování přirozených rezistencí a sledování fenotypů. Ve druhé fázi kvalifikovaný mikrobiolog validuje měření. Součástí přístroje je automatické uložení do databáze a archiv. Všechna data jsou on-line přenášena do laboratorního informačního systému. To eliminuje riziko chyby „lidského faktoru“.

4.1.5.2. Diluční metoda v mikrodestičkách

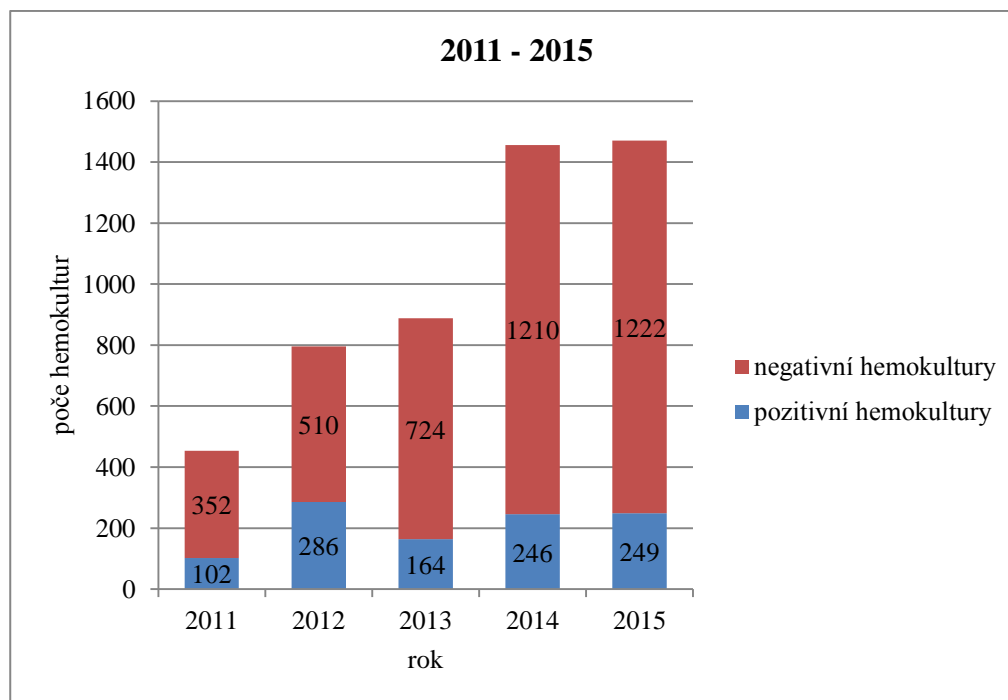
Připravíme inokulum narostlé kultury o počtu 2–5 kolonií ve 2 ml Mueller-Hinton bujonu, kultivace probíhá 2 hodiny při 37 °C v termostatu. Poté objem inokula smícháme s 10 ml fyziologického roztoku a pomocí jehlového inokulátoru očkujeme do mikrotitrační destičky. Používá se zmražená, komerčně vyrobená mikrotitrační destička, s počtem 12 sloupců po 8 řádcích (celkem 96 jamek) pro 12 antibiotik. Kultivace je 18 až 20 hodin při 37 °C. Hodnotí se minimální inhibiční koncentrace antibiotika, která se projeví jako zábrana růstu daného mikroba.

5. Výsledky

Ke sledování a diagnostice novorozeneckých sepsí se provádí odběr hemokultur. Pozitivní hemokultura svědčí o infekci krevního řečiště. V období od roku 2011 až 2015 bylo na novorozeneckém oddělení Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem odebráno celkem 5271 hemokultur. Z celkového počtu všech odebraných hemokultur bylo 1047 pozitivních. Počet odběrů za každý sledovaný rok, počty pozitivních a negativních, jsou uvedeny a znázorněny v tabulce č. 1 a grafu č. 1.

Tabulka 1 - Počty odebraných hemokultur na novorozeneckém oddělení v MNUL v období 2011-2015

ROK	CELKOVÝ POČET HEMOKULTUR [ks]	POZITIVNÍ HEMOKULTURY [ks]	NEGATIVNÍCH HEMOKULTURY [ks]
2011	660	102	558
2012	796	286	510
2013	888	164	724
2014	1456	246	1210
2015	1471	249	1222

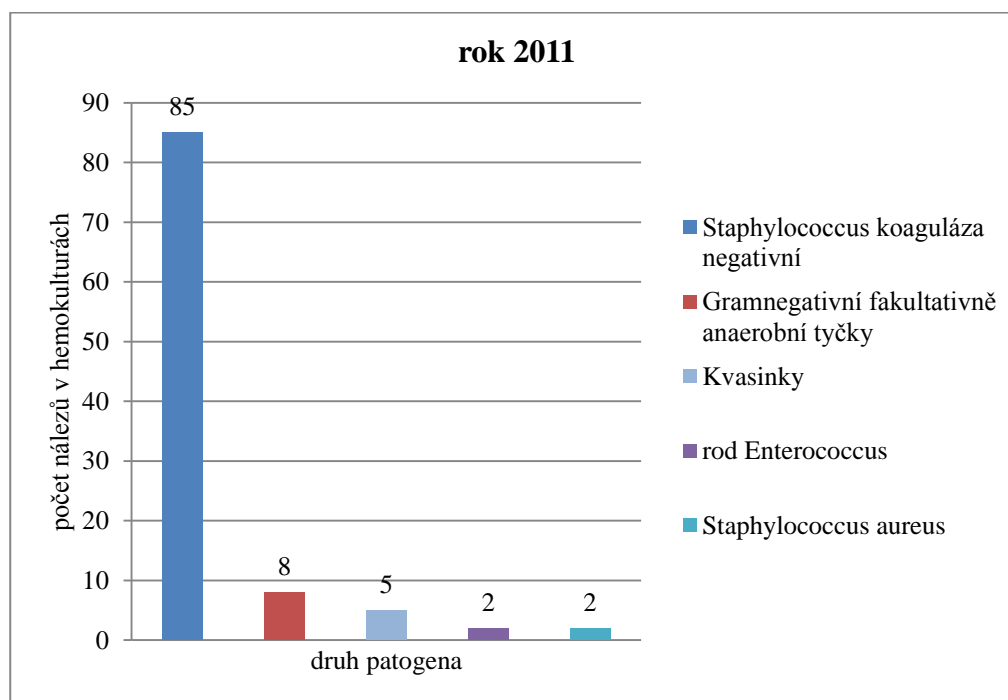


Graf 1 - Poměr hemokultur v MNUL za období 2011–2015

Frekvence výskytů nejčastějších bakteriálních druhů jsou uvedeny v následujících tabulkách a grafech. Na prvním místě, s největším počtem výskytů, je *Staphylococcus koagulázanegativní*. Jeho počet každý rok jednoznačně převyšuje zástupce ostatních rodů. Zbylé rody jsou zastoupeny v menšině.

Tabulka 2 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2011

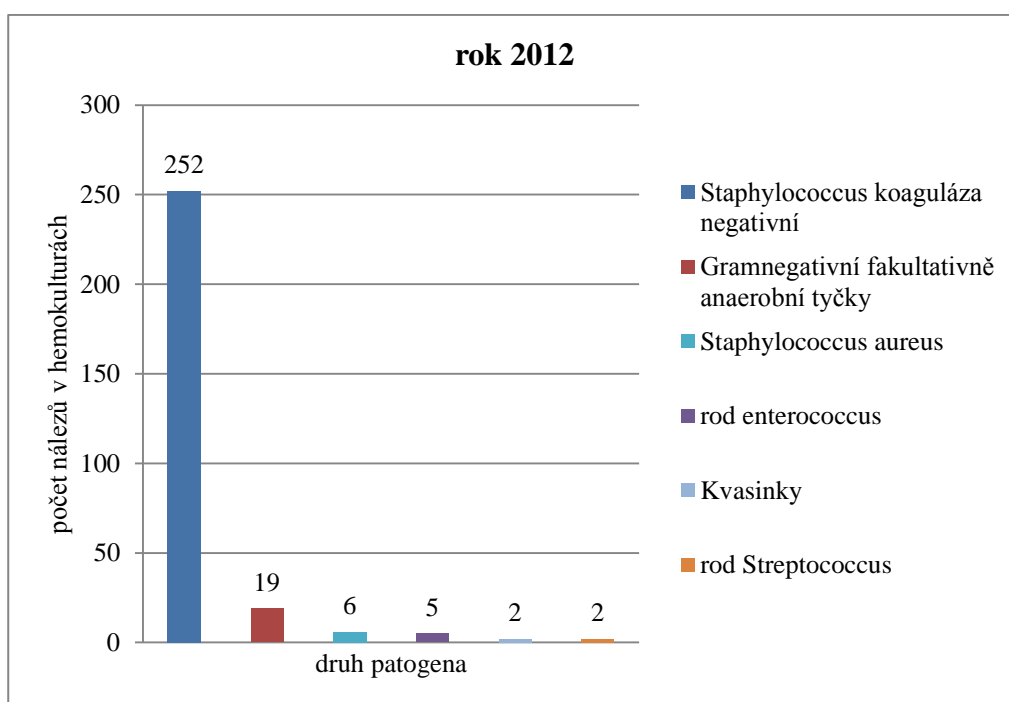
Bakteriální druh	počet
<i>Staphylococcus koagulázanegativní</i>	85
Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky	8
Kvasinky	5
rod <i>Enterococcus</i>	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	2



Graf 2 - Nejčastější bakteriální druhy v pozitivních hemokulturách v MNUL v roce 2011

Tabulka 3 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2012

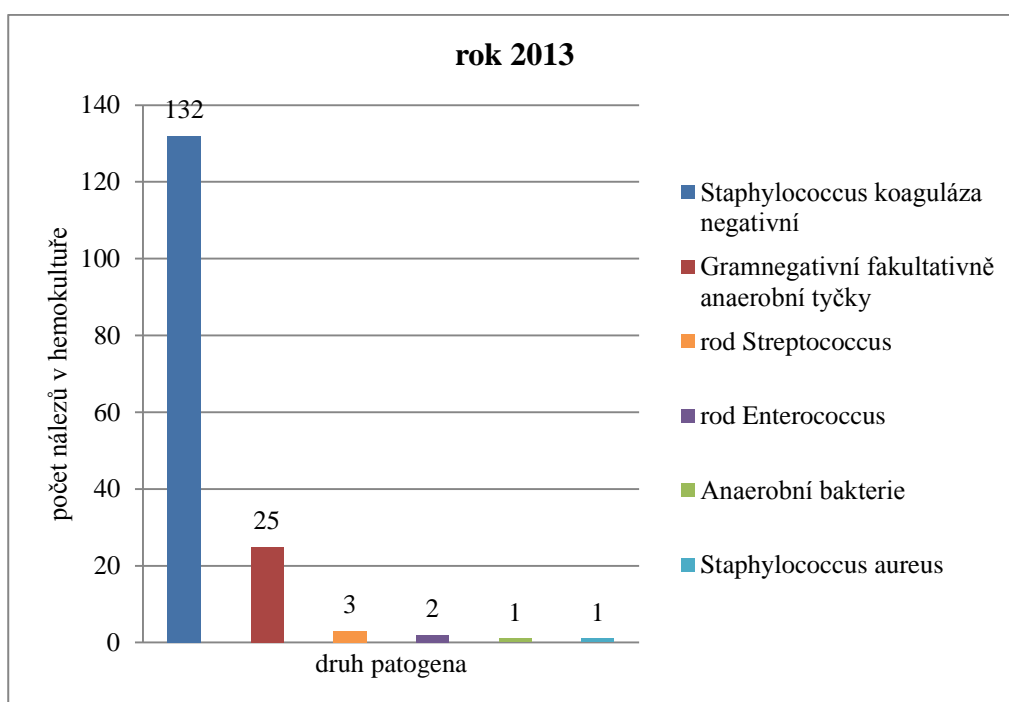
Bakteriální druh	počet
<i>Staphylococcus koagulázanegativní</i>	252
Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky	19
<i>Staphylococcus aureus</i>	6
rod <i>Enterococcus</i>	5
Kvasinky	2
rod <i>Streptococcus</i>	2



Graf 3 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2012

Tabulka 4 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2013

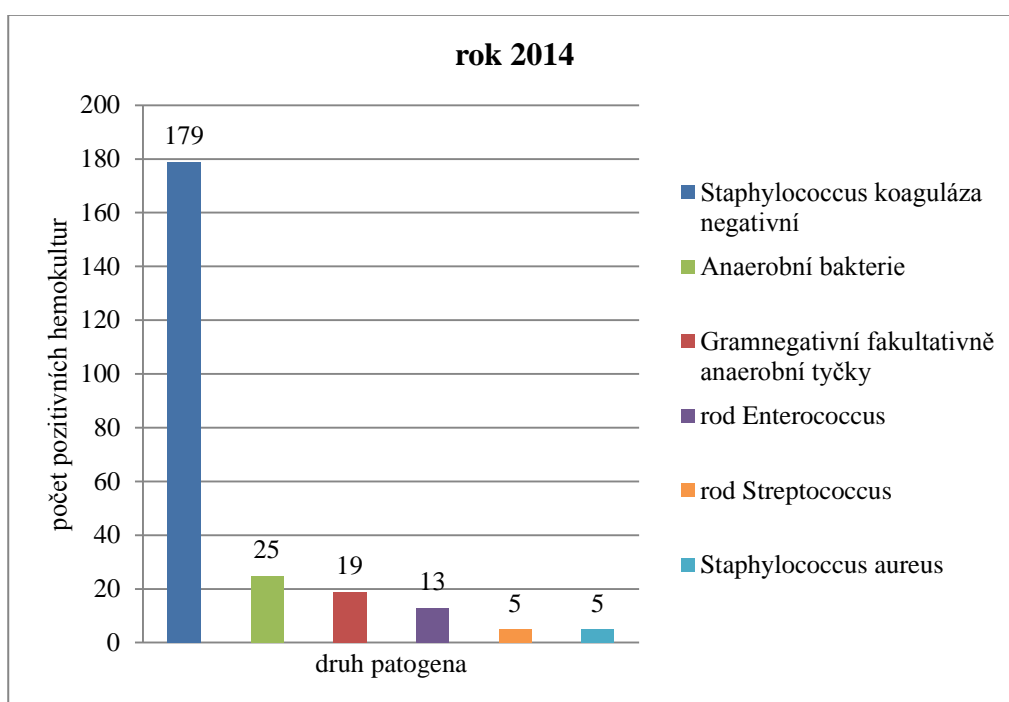
Bakteriální druh	počet
<i>Staphylococcus koagulázanegativní</i>	132
Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky	25
rod <i>Streptococcus</i>	3
rod <i>Enterococcus</i>	2
Anaerobní bakterie	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1



Graf 4 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2013

Tabulka 5 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2014

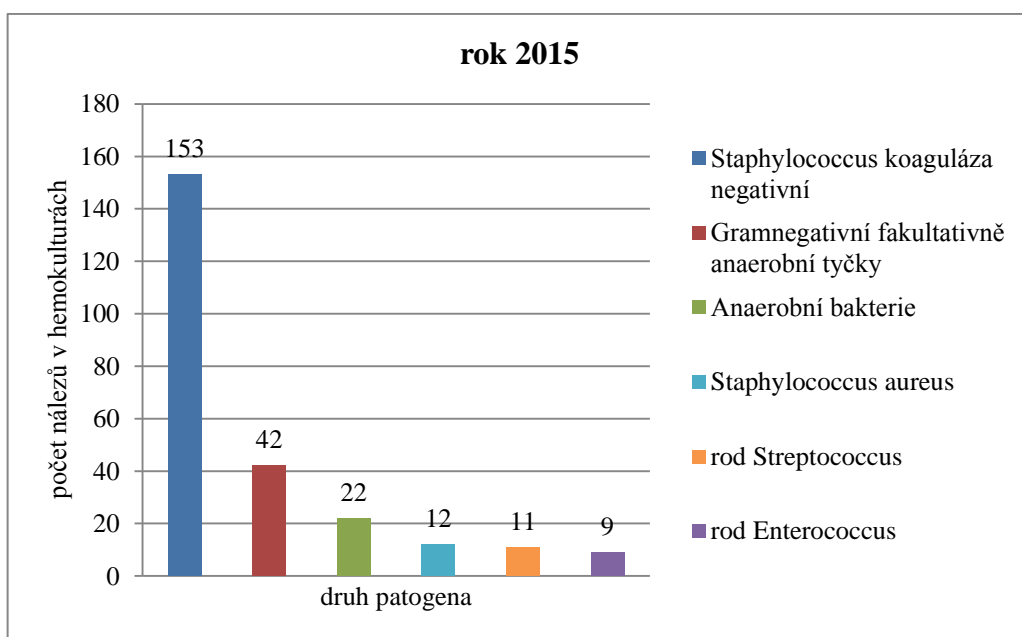
Bakteriální druh	počet
<i>Staphylococcus koagulázanegativní</i>	179
Anaerobní bakterie	25
Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky	19
rod <i>Enterococcus</i>	13
rod <i>Streptococcus</i>	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	5



Graf 5 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2014

Tabulka 6 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2015

Bakteriální druh	počet
<i>Staphylococcus koagulázanegativní</i>	153
Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky	42
Anaerobní bakterie	22
<i>Staphylococcus aureus</i>	12
rod <i>Sreptococcus</i>	11
rod <i>Enterococcus</i>	9

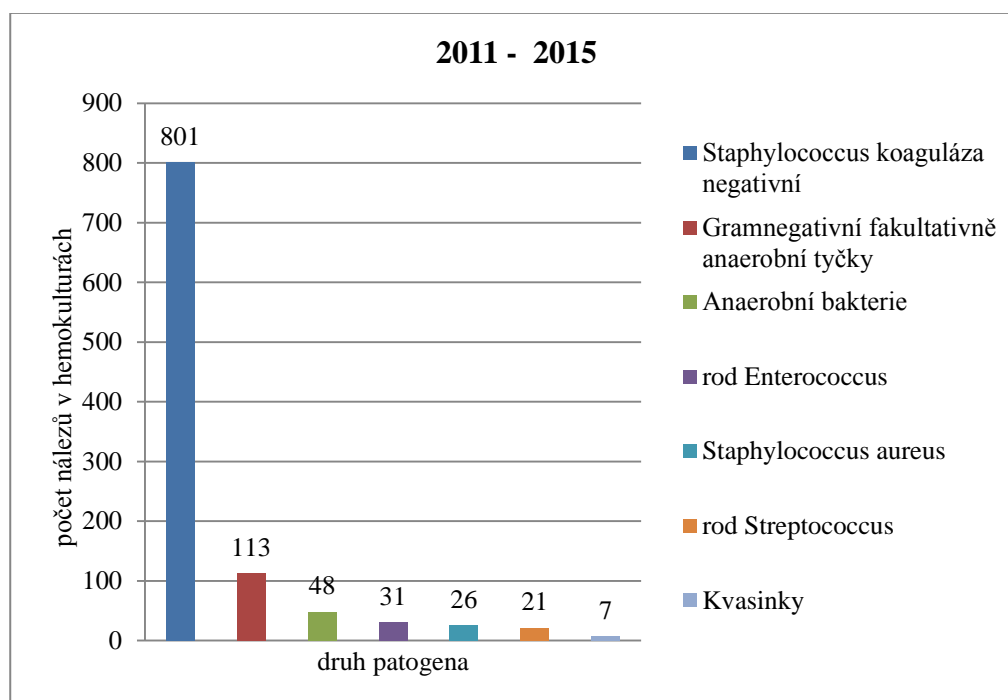


Graf 6 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2015

Z celkového vyhodnocení všech pozitivních hemokultur a jejich rozdělení podle původců vyvolávajících novorozenecké sepse vyplývá, že vysoké zastoupení bakterií *Staphylococcus* koagulázanegativní, které jednoznačně vždy v každém roce převyšovalo svým počtem zbylé druhy, se odrazilo i v celkovém hodnocení všech bakteriálních druhů.

Tabulka 7 - Přehled celkového počtu bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách za sledované období 2011–2015 v MNUL

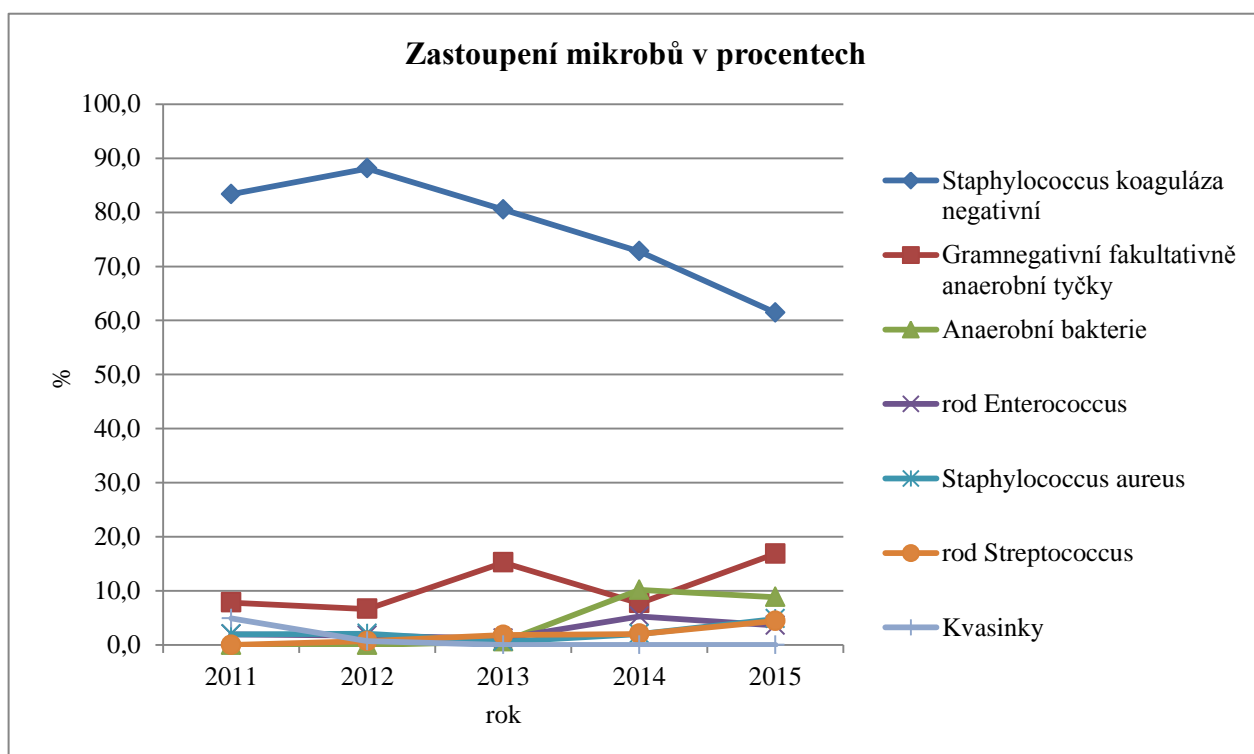
Bakteriální druh	počet	tj. %
<i>Staphylococcus</i> koagulázanegativní	801	76,5
Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky	113	10,8
Anaerobní bakterie	48	4,6
rod <i>Enterococcus</i>	31	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	26	2,5
rod <i>Sreptococcus</i>	21	2
Kvasinky	7	0,7



Graf 7 - Celkový počet bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách za sledované období 2011–2015

Tabulka 8 - Procentový přehled výskytu celkového počtu bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách za sledované období 2011–2015 v MNUL

Bakteriální druh	rok				
	2011	2012	2013	2014	2015
<i>Staphylococcus</i> koagulázanegativní	83,3	88,1	80,5	72,8	61,4
Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky	7,8	6,6	15,2	7,7	16,9
Anaerobní bakterie	0,0	0,0	0,6	10,2	8,8
rod <i>Enterococcus</i>	2,0	1,7	1,2	5,3	3,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,0	2,1	0,6	2,0	4,8
rod <i>Streptococcus</i>	0,0	0,7	1,8	2,0	4,4
Kvasinky	4,9	0,7	0,0	0,0	0,0



Graf 8 - Procentový přehled bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách za sledované období 2011–2015

6. Diskuze

Septický stav je velmi závažné a život ohrožující onemocnění. Přímé potvrzení diagnózy je možné pouze vyšetřením hemokultur.

Během sledovaného období 2011–2015 bylo na novorozeneckém oddělení Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem odebráno celkem 5271 hemokultur. Z tohoto celkového počtu bylo 1047 hemokultur pozitivních, což činí 20 % všech odebraných hemokultur. V roce 2011 bylo odebráno 660 hemokultur (z toho 102 pozitivních), v roce 2012 bylo odebráno 796 hemokultur (z toho 286 pozitivních), v roce 2013 bylo odebráno 888 (z toho 164 pozitivních), v roce 2014 bylo odebráno 1456 (z toho 246 pozitivních) a v roce 2015 bylo odebráno 1471 hemokultur (z toho 249 pozitivních). Z uvedeného vyplývá, že v letech 2014 a 2015 zaznamenal odběr vzorků na hemokultivaci dramatický nárůst, a to téměř o 50 %. Faktorů, podílejících se na takovém nárůstu, může být hned několik.

Jedná se o vývoj a rozvoj zdravotnické péče v oblasti neonatologie, péči o novorozence s velmi nízkou porodní váhou a extrémně nevyzrálé novorozence, a v neposlední řadě i o velikost spádové oblasti, kterou svojí péčí pokrývá Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem. Nezanedbatelný vliv může mít i skutečnost, že oddělení klinické mikrobiologie v MNUL začalo v roce 2014 používat nový automatizovaný hemokultivační systém VersaTREK/ESP (kultivační systém II). Lahvičky pro tento systém distribuuje a poskytuje samo oddělení OKM a to bezplatně pro všechna oddělení nemocnice.

Ve studii Fakultní nemocnice Brno (dále jen FN Brno) na pracovišti dětské medicíny, se uvádí, že v roce 2011 zachytili 190 pozitivních hemokultur. Ve stejném roce bylo v MNUL zachyceno pouze 102 pozitivních hemokultur. V následujících letech ale došlo v MNUL ke zvýšenému zachytu pozitivních hemokultur a jejich počet je nyní obdobný jako ve FN Brno. Údaje z obou nemocnic lze srovnat pouze rámcově, neboť ve FN Brno neznáme celkový počet odebraných hemokultur.

Dostupné údaje z celostátního sledování neonatální sepse ve státě Minnesota, během období 2010 až 2014 zahrnující identifikaci sepse z krve a mozkomíšního moku, ukazují daleko menší počty pozitivních hemokultivací. V roce 2010 zde bylo nahlášeno 58 záchytů, v roce 2011 56, v roce 2012 40, následující rok 2013 36 a v roce 2014 bylo nahlášeno 60 pozitivních hemokultur. Tyto čísla jsou o polovinu menší než záchyty

pozitivních hemokultivací v MNUL. Minnesota během celého sledovaného období měla pouze 250 pozitivních hemokultur. Potom tedy počet výskytu pozitivních hemokultur v MNUL je značně vysoký. Nevíme, jaké důvody takový rozdíl způsobují, ale určitě nepůjde o vliv jen jednoho faktoru.

Záchyt jednotlivých druhů bakteriálních patogenů je výrazně ovlivněn zdrojem nákazy, životní úrovní, sociálním složením a zdravotním stavem obyvatelstva. Světová literatura uvádí, že nejčastějším původcem časně novorozenecké sepse je *Streptococcus agalactiae*, následuje *Escherichia coli* a to hlavně u novorozenců s nízkou porodní váhou. Mezi nejčastější původce pozdní novorozenecké sepse patří *Staphylococcus koagulázanegativní*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* a *Staphylococcus aureus*.

V souboru výskytu jednotlivých patogenů jako původců novorozenecké sepse, jak ukazují tabulky a grafy, je nejčastěji zachycený bakteriální druh každý rok v pozitivních hemokulturách *Staphylococcus koaguázanegativní* a to s 801 záchyty během pětiletého období, což činí 76,5 % ze všech zachycených patogenů. Z výsledků je zřejmé, že ve všech sledovaných letech patřily bakterie této skupiny k nejfrekventovanějším nálezům v pozitivních hemokulturách. Na velkém záchytu *Staphylococcus koagulázanegativních* bakterií v pozitivních hemokulturách mohou mít vliv chyby z preanalytické fáze. Tyto chyby nemohou pracovníci laboratoře ovlivnit a ani není možné posoudit, zda k těmto chybám opravdu došlo. Světlo by do této problematiky vneslo určitě pravidelné provádění stěru z místa vpichu před odběrem hemokultury. To není vždy dodrženo. Svoji roli zde může hrát používání pupečnickové krve a žilních vstupů pro odebrání na hemokultivaci. K interpretaci takových výsledků je tedy potřeba přistupovat velmi opatrně a to jak ze strany lékaře mikrobiologa, tak ze strany neonatologa.

Ostatní zástupci, způsobující septický stav novorozence, jsou zastoupeny v celkovém hodnocení v daleko menším počtu. Mezi mikroorganismy s druhým nejčastějším výskytem můžeme zařadit gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky s počtem 113 záchytů. Pak následují anaerobní bakterie (48), rod *Enterococcus* (31), *Staphylococcus aureus* (26), rod *Streptococcus* (21) a kvasinky se 7 záchyty během období pěti let. Jak názorně ukazují grafy a tabulky, zobrazující jednotlivý výskyt zachycených mikroorganismů každý rok, je pořadí proměnlivé. Přehled zachycených patogenů ve FN Brno za rok 2011 je obdobného složení, jako jsou původci novorozenecké sepse v MNUL. Zde je také na prvním místě *Staphylococcus*

koagulázanegativní následován gramnegativními fakultativně anaerobními tyčkami, rodem *Enterococcus* a druhem *Staphylococcus aureus*.

Za zajímavost lze považovat stoupající trend záchytu anaerobních bakterií. Srovnáním s výskytem ve FN Brno za rok 2011, kde byl jeden jediný záchyt a v MNUL za rok 2011 v této době žádný výskyt lze zpozorovat, že skutečnost nárůstu, jak zobrazují grafy a tabulky v následujících letech, je dosti překvapivá. Ale v období 2014–2015 bylo v našem souboru zachyceno 47 patogenů anaerobního původu, což činí značný nárůst během sledovaného období. Tento fakt může být způsoben instalací nového hemokultivačního přístroje VersaTREK/ESP kultivační systém II na OKM v MNUL v roce 2014, který nabízí větší citlivost a podmínky pro záchyt těchto bakterií.

Pokud srovnáme naše údaje o výskytu jednotlivých patogenů v pozitivních hemokulturách s pracovištěm v Minnesotě v letech 2010–2014, pak je výskyt jednotlivých původců novorozenecké sepse v MNUL úplně jiného složení. Američtí autoři uvádějí na prvním místě zástupce rodu *Streptococcus*, hlavně *Streptococcus agalactiae* a to až s 95 záchyty. Za zmínku stojí ještě vyšší počet záchytů rodu *Haemophilus* (12) během sledovaného období. Další skladba patogenů je obdobná jako v MNUL. Rozdíly v počtech ostatních druhů už nejsou tak veliké.

Z porovnaných výsledků vyplývá, že screening těhotných žen na nosičství GBS (Group B *Streptococcus* = *Streptococcus agalactiae*) v ČR, má příznivý vliv na rozvoj sepse u novorozence způsobenou tímto mikroorganismem.

Ze získaných údajů vyplývá, že diagnostika a léčba novorozenecké sepse je stále více aktuální. Odběrům na hemokultivační vyšetření je proto potřeba věnovat zvýšenou pozornost a to jak ve fázi preanalytiky, analytiky tak i postanalytiky. Riziko případné kontaminace je potřeba snížit na minimum. Lékaři pak musejí posuzovat rozvoj a vývoj tohoto onemocnění nejen podle laboratorních nálezů, z více klinických pohledů.

7. Závěr

Novorozenecká sepe je závažné a život ohrožující onemocnění a proto stojí v popředí zájmu neonatologů. Nejvíce jsou ohroženy děti extrémně nezralé, kterých v současné době s rozvojem medicíny přibývá. V současné době neexistuje žádný klinický postup, který by spolehlivě identifikoval přítomnost sepse. Automatizovaný hemokultivační systém VersaTREK/ESP, přístroje VITEK 2 COMPACT 30 a MALDI-TOF, které používá oddělení OKM v MNUL, rychle detekuje původce septického stavu. Jejich výhodou je eliminace rizika kontaminace při laboratorní manipulaci, úspora kultivačních pěstí a pracovního personálu. To vše společně přináší rychlé stanovení citlivosti a identifikaci mikroorganismu vyvolávajícího septický stav a napomáhá zahájit lékařům u novorozence včasnou léčbu vhodnými antibiotiky. Celkový počet odebraných hemokultur na novorozeneckém oddělení v MNUL během pětiletého období činí 5271 a vypovídá o důležitosti tohoto vyšetření. Z tohoto počtu bylo 1047 pozitivních. To představuje 20 % z celkového počtu odebraných hemokultur. Výskyt bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách během sledovaného období v letech 2011–2015 je dosti rozmanitý. Z celkového počtu pozitivních hemokultur připadá největší zastoupení pro mikroorganismus *Staphylococcus* koagulázanegativní, což je 76,5 %. Srovnáním s ostatními původci je tento výskyt dosti vysoký. Ale nelze zde vyloučit kontaminaci kožní mikroflórou. Proto hodnocením takových nálezů je potřeba věnovat větší pozornost.

V současné době zaznamenáváme velký rozvoj diagnostiky sepse pomocí molekulárních metod, jako jsou PCR a genetické sondy. To urychluje diagnostiku původců, ale vzhledem k rozmanitosti původců sepse jde o metody finančně náročné. A proto budou automatizované hemokultivační systémy ještě dlouhou dobu patřit mezi nejpoužívanější metody při diagnostice sepse.

8. Zkratky

ATB – antibiotikum

CAMP test – test sloužící k odlišení beta-hemolytických streptokoků

cm – centimetr

¹⁴C – radioaktivní uhlík

CO₂ – oxid uhličitý

FN Brno – Fakultní nemocnice Brno

GBS – *Group B Streptococcus (Streptococcus agalactiae)*

H₂ – vodík

IgG – Imunoglobulin G

JIP – jednotka intenzivní péče

MALDI-TOF – *Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight* (Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem)

ml – mililitr

MNUL – Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem

N₂ – dusík

NaCl – chlorid sodný

O₂ – kyslík

OKM – oddělení klinické mikrobiologie

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Polymerázová řetězová reakce)

pH – *potential of hydrogen* (záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových iontů)

SIRS – *Systemic inflammatory response syndrome* (systémová zánětlivá reakce)

TFA – TriFluoroacetic Acid (kyselina trifluoroctová)

9. Seznam tabulek

Tabulka 1 - Počty odebraných hemokultur na novorozeneckém oddělení v MNUL v období 2011- 2015.....	40
Tabulka 2 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2011	41
Tabulka 3 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2012	42
Tabulka 4 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2013	43
Tabulka 5 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2014	44
Tabulka 6 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2015	45
Tabulka 7 - Přehled celkového počtu bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách za sledované období 2011–2015 v MNUL.....	46
Tabulka 8 - Procentový přehled výskytu celkového počtu bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách za sledované období 2011–2015 v MNUL.....	47

10. Seznam grafů

Graf 1 - Poměr hemokultur v MNUL za období 2011–2015	40
Graf 2 - Nejčastější bakteriální druhy v pozitivních hemokulturách v MNUL v roce 2011	41
Graf 3 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2012	42
Graf 4 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2013	43
Graf 5 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2014	44
Graf 6 - Nález bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách v MNUL za rok 2015	45
Graf 7 - Celkový počet bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách za sledované období 2011– 2015	46
Graf 8 - Procentový přehled bakteriálních druhů v pozitivních hemokulturách za sledované období 2011– 2015	47

11. Seznam obrázků

Obrázek 1 - <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Obrázek 2 - <i>Staphylococcus aureus</i> s viditelnou hemolýzou	18
Obrázek 3 - <i>Escherichia coli</i>	21
Obrázek 4 - <i>Haemophilus influenzae</i>	22
Obrázek 5 - Přístroj Bact-ALERT 3D	31
Obrázek 6 - Odběrové lahvičky systému Bact/ALERT	31
Obrázek 7 - Přístroj Bact-ALERT 3D	31
Obrázek 8 - Přístroj VersaTREK/ESP kultivační systém	32
Obrázek 9 - Přístroj VersaTREK/ESP kultivační systém s otevřeným boxem	32
Obrázek 10 - Odběrové lahvičky VersaTREK REDOX 1 a REDOX 2	32
Obrázek 11 - Odběrové lahvičky VersaTREK REDOX 1 a REDOX 2 s nasazeným konusem.....	32
Obrázek 12 - Barvicí automat Poly Stainer	34
Obrázek 13 - Hmotnostní spektrometr IVD MALDI Biotyper System.....	38

12. Použitá literatura

1. ČERNÝ, V., et al. *Sepse v intenzivní péči. 2. rozšířené vydání.* Praha : Maxdorf, 2005. stránky 14-15, 59. ISBN 80-7345-0554-2.
2. ČERMÁK, P., et al. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště.* Praha : Maxdorf, 2008. stránky 9-13, 24, 28-29, 36, 41-45, 47. ISBN 978-80-7345-142-4.
3. SCHARFEN, J. ml. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii.* Hradec Králové : Nucleus, 2013. stránky 96, 101-102. ISBN 978-80-87009-32-1.
4. BUCHANEC, J., et al. *Repetitorium pediatra.* Martin : Osveta, 1994. stránky 826, 828. ISBN 80-217-0507-8.
5. VELEMÍNSKÝ, M., ŠVIHOVEC, P., et al. *Infekce plodu a novorozence.* Praha : Triton, 2005. stránky 19-24. ISBN 80-7254-614-7.
6. FENDRYCHOVÁ, J. a BOREK, I., et al. *Intenzivní péče o novorozence.* Brno : NCO NZO, 2012. stránky 23, 26-27, 32. ISBN 978-80-7013-547-1.
7. JANOTA, J., STRAŇÁK, Z., et al. *Neonatologie.* Praha : Mladá fronta, 2013. stránky 408-409. ISBN 978-80-204-2994.
8. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální.* Brno : Neptun, 2003. stránky 64, 99, 108, 117, 127, 129, 130 . ISBN 80-902896-6-5.
9. MELTER, O., MALMGREN, A. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie.* Praha : Karolinum, 2014. stránky 13, 87, 129-130. ISBN 978-80-246-2414-3.
10. VOTAVA, M., et al. *Lékařská mikrobiologie II.: Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii.* Brno : Masarykova univerzita, 2003. stránky 159, 267-271. ISBN 80-210-2272-8.
11. BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie.* Praha : Marvil, 1996. stránky 265-266, 288-291. ISBN 80-2380-297-6.
12. **Systems, TREK Diagnostic.** VERSATREK Lahvičky na hemokultury. místo neznámé : BioVendor - Laboratorní medicína a.s., 2010. stránky 1-6.
13. PŘECECHTĚL, F. *Lékařská mikrobiologie II. Praktikum – vyšetřovací metody.* Brno : autor neznámý, 1992. str. 258. 1101-6766 Y-9C-E-1-00-6-76-6.
14. BRUKER, DALTONIK GMBH. *MALDI Biotyper 3.0.* Bremen : s.n., 2011. pp. 16-19, 158-162. #269025#987654.
15. BUCHTA, V., JÍLEK, P. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty.* Praha : Karolinum, 1998. str. 192. ISBN 80-7184-565-5.
16. HAVLÍN, J., et al. *Infektologie. 2. vydání.* Praha : Avicenum, 1990. str. 393. ISBN 80-201-0062-8.
17. **Health, Minnesota Department of.** Neonatal sepsis (Bacteria) Statistics. [Online] 2015. 7. 28. [Citace: 2015. 8. 6.] <http://www.health.state.mn.us/divs/idepc/dtopics/neosep/statistics.html>.
18. **BRUKER.** Posterhall MALDI Biotyper. [Online] 5. 3., 2015. [Cited: 2. 1., 2016.] Brochure: Posterhall MALDI Biotyper, 03-2011 (8270680) <https://www.bruker.com/nc/news-records/single-view/article/bruker-announces-fda-clearance-for-second-expanded-claim-for-the-maldi-biotyper-ca-system-2.html>.

19. **HUSA, P., KRBCOVÁ, L., et al.** *Infekční lékařství*. Brno : Masarykova univerzita, 2011. str. 159. ISBN 678-80-210-5660-2.
20. **CHVÁTALOVÁ, J.** *Kultivační nálezy z hemokultur od pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Brno v roce 2011*. Brno : Bakalářská práce na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity. Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Markéta Hanslianová, 2012. str. 77.
21. **POLÁČEK, K., et al.** *Fyziologie a patologie novorozence*. Praha : Avicenum, 1981. str. 429.
22. **STOŽICKÝ, F., PIZINGEROVÁ, K.** *Základy dětského lékařství*. Praha : Karolinum, 2006. str. 359. ISBN 80-246-1067-1.
23. **SVOBODOVÁ, J., et al.** Možnosti snížení incidence infekce krevního řečiště u novorozenců. [Online] 10.. 11. 2010. [Citace: 2016. 3. 24.]
<http://zdravi.e15.cz/clanek/sestra/moznosti-snizeni-incidence-infekci-krevniho-reciste-u-novorozencu-455793>.
24. **ŠRÁMKOVÁ, H., et al.** *Nozokomiální nákazy II*. Praha : Maxdorf, 2001. str. 303. ISBN 80-85912-25-2.
25. **WHO.** Neonatal sepsis - a major killer to be tackled in communities. [Online] 19.. 1. 2010. [Citace: 2015. 8. 6.]
www.who.int/maternal_child_adolescent/news_events/news/2009/19_01/en.
26. **MERCK.** Neonatal Sepsis. [Online] 10. 2015. [Cited: 3. 1., 2016.]
<http://www.merckmanuals.com/professional/pediatrics/infections-in-neonates/neonatal-sepsis>.
27. **VELEMÍNSKÝ, M., POTUŽNÍK, V.** *Infekce plodu a novorozence*. Praha : Avicenum, 1984. str. 153. ISBN neuvedeno.