

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**

## **Diplomová práce**

**Využití hemokultivačního systému (Bactec) pro detekci  
bakterií přítomných na povrchu cévních katétrů.**



Vedoucí diplomové práce: MUDr. Pavel Čermák, CSc.

## **Prohlášení**

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě diplomovou práci zpracovanou v průběhu studia na Farmaceutické fakultě Karlovy univerzity v Hradci Králové.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím odborné literatury a pramenů uvedených v seznamu, který je součástí této diplomové práce.

V Hradci Králové: .....

.....

podpis studenta

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce MUDr. Pavlu Čermákovi, CSc., za poskytnuté materiály, cenné rady a přátelský přístup po celou dobu vypracovávání této diplomové práce.

Chtěla bych také poděkovat svým rodičům, příteli a známým za podporu po celou dobu studia.

## ANOTACE DIPLOMOVÉ PRÁCE

SCHWARZEROVÁ, A. *Využití hemokultivačního systému (Bactec) pro detekci bakterií přítomných na povrchu cévních katétrů*. Hradec Králové: Katedra biologických a lékařských věd, Fakulta farmaceutická UK, 2007, 60s. Diplomová práce, vedoucí Čermák, P.

Cíl: Cílem této práce bylo posoudit využití hemokultivačního systému Bactec pro detekci bakterií a porovnat výsledky vykultivovaných mikrobů s klinickým stavem pacienta.

Metoda: Metoda je založena na vytřepávání katétru ve fyziologickém roztoku. Fyziologický roztok s vytřepanými mikroby byl injikován do hemokultivační lahvičky Bactec Standard . Na základě TTD (time to detection) byla stanovena kvantita. Hraniční hodnota pro posouzení katéetrové sepse byla  $10^3$  mikrobů.

Závěr: Tato metoda má v diagnostice katéetrové sepse výhodu v tom, že je rychlá a snadná na provedení. Pro přesné stanovení diagnózy je dobré tuto metodu kombinovat s krevními kulturami a konzultovat výsledek s lékařem.

## ANNOTATION OF THESIS

SCHWARZEROVÁ, A. *The use of hemoculture Bactec for detection of bacteria present on the surface of vascular catheters*. Hradec Králové: Department of biological and medical sciences, College of Pharmacy UK, 2007, 60 p. Thesis, Čermák, P.

Objective: The objective of this thesis was to review the use of hemoculturel system Bactec for detecting the amount of bacteria present on the surface of the vascular catheters and to compare the results of the cultivated bacteria with the clinical condition of the patient.

The method: The method is based on shaking the catheter in physiological solution. The physiological solution with the bacteria from the catheter was added to hemoculturel bottle Bactec Standard Aerobic. The Quantity of bacteria was based on TTD (time to detection). The Border value was  $10^3$  bacteria for diagnosing catheter sepsis.

Conclusion: This method of diagnosing catheter sepsis is fast and easy to carry out. For accurate diagnosis, it is advisable to combine this method with blood cultures and consult the result with the doctor.

# Obsah

Seznam zkratk	6
Seznam tabulek	7
Seznam obrázků	8
Úvod	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 Obecné pojmy	10
1.1.1 Definice bakteriémie	10
1.1.2 Definice sepse	10
1.1.3 Septický šok	10
1.1.4 MODS (Multiple Organ Dysfunction)	10
1.1.5 SIRS (Systematic Inflammatory Response Syndrom)	11
1.1.6 Pojmy týkající se infekce centrálního žilního katétru	11
1.2 Patofyziologie vzniku sepse	12
1.2.1 Systémová odpověď	12
1.2.2 Kardiovaskulární změny	13
1.2.3 Klinický obraz	14
1.3 Patogeneze katérové sepse	15
1.3.1 Dispozice vzniku sepse	15
1.3.2 Patogenní ukazatelé infekcí spojených s katétrem	16
1.3.3 Biofilm	16
1.4 Typy intravaskulárních katetrů	20
1.5 Původci katérových sepsí	21
1.6 Diagnostika katérových sepsí	24
1.6.1 Kultivační techniky krve	24
1.6.2 Kultivační techniky špičky CVC	26
1.6.3 Další metody kultivace CVC	28
1.6.4 Rychlé diagnostické techniky	29
1.7 Automatizované hemokultivační systémy	30
1.7.1 Systém Bactec 9120	30
1.7.2 BacT/Alert	33
1.7.3 Výhody a nevýhody automatizovaných hemokultivačních systémů	37
1.7.4 Hygiena a ochranné prostředky	38
1.7.5 Dezinfekce místa vpichu	39
1.7.6 Volba místa vpichu	39
1.7.7 Tunelizovaný katétr	40
1.7.8 Počet a délka zavedení katétru	40
1.7.9 Školení personálu	41

1.8	Terapeutická doporučení.....	41
1.8.1	Technika antibiotického zámku .....	41
1.8.2	Terapeutická doporučení týkající se nejčastějších mikrobů způsobující katéetrovou sepsi .....	42
2	PRAKTICKÁ ČÁST .....	44
2.1	Laboratorní pomůcky.....	44
2.2	Postup práce .....	44
2.3	Zpracování výsledků.....	46
3	DISKUSE.....	51
4	ZÁVĚR .....	55
	Seznam použité literatury .....	56
	Seznam příloh .....	60

## Seznam zkratek

Agr	Accessory gene regulator
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APC	Aktivovaný protein C
ARDS	Akutní syndrom dechové tísně (Acute respiratory distress syndrome)
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
CFU	Colony Forming Unit
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
CRI	Catheter Related Infection
CVC	Central Venous Catheter
DIC	Diseminovaná intravaskulární koagulopatie
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
HIV	Human immunodeficiency virus
HSP	Heat Shock Protein
LIS	Laboratorní informační systém
IL	Interleukin
LPB	Lipopolysacharid binding protein
LPS	Lipopolysacharid
MARS	Mixed Antagonist Response Syndrome
MODS	Multiple organ Dysfunction Syndrome
MOF	Multiple Organ Failure, víceorgánové selhání
PAF	Platelet Activating Factor – destičky aktivující faktor
PGA	Poly-gama-DL glutamová kyselina
PIA	Polysacharid intracelulární adhezin
QS	Quorum sensing
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome, syndrom systémové zánětlivé reakce organismu na zátěž
sCD14	Solubilní (rozpustný) antigen CD14
TFPI	Inhibitor tkáňového faktoru
TLR	Toll-like receptory
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor Alfa
TTD	Time To Detection
NN	Nozokomiální nákaza
SPS	Polyanetholsulfát sodný

## Seznam tabulek

Tab. 1 - Mikroorganismy zastoupené nejčastěji při katetrových hematogenních infekcích.....	22
Tab. 2 - Celková shoda výsledků kultivace s klinickým stavem pacienta.....	46
Tab. 3 - Kontingenční tabulka, vyjádření falešně pozitivních a falešně negativních vzorků .....	47
Tab. 4 - Vykultivované mikroby z katétru, které byly původci prokázané katérové sepse.....	48
Tab. 5 - Vyjádření kvantity mikrobů u pozitivního a negativního klinického stavu. Znázornění obtížnosti vytvořit hraniční hodnotu pro jednoznačné určení katérové sepse .....	49
Tab. 6 - Porovnání výsledků krevní kultivace s kultivací katétru v závislosti na klinickém stavu pacienta.....	50
Tab. 7 - Korelace krevní kultivace s kultivací katétru ve vztahu ke klinickému stavu pacienta .....	50



## Seznam obrázků

Obr. 1 - Aktivace proteinu C u pacientů s těžkou sepsi .....	14
Obr. 2 - Kontaminace, kolonizace a infekce katétru .....	15
Obr. 3 - Tvorba biofilmu v katétru .....	17
Obr. 4 - Biofilm vytvořený za 24 hodin .....	19
Obr. 5 - Biofilm vytvořený na katétru za 2 dny.....	19
Obr. 6 - Princip hemokultivačního systému Bact/Alert.....	34
Obr. 7 - Schéma víceramenného katétru s třemi prameny a luminy.....	39

## Úvod

Těžká sepe je dnes významným medicínským a ekonomickým problémem. Na rozdíl od jiných nemocí je spojená se stoupající incidencí a se vzestupným počtem úmrtí. (Vincent, 2006)

Výskyt onemocnění se ročně zvyšuje přibližně o 1,5% - 8% v souvislosti s nárůstem počtu predisponovaných osob. (Hoyert, 1999) Udává se, že progresse do stádia těžké sepe je na jednotce intenzivní péče zaznamenávána u každého čtvrtého pacienta se sepsí. V USA je situace obdobná. Ročně je hlášeno 500 000 případů sepe a mortalita zůstává velmi vysoká – 30 až 50%.

Sepe není jen medicínským a společenským problémem, ale je také nemocí, která hraje významnou roli v ekonomice zdravotnictví. Celkové náklady na léčbu těžké sepe v rozvinutých zemích přesahují 25 miliard € ročně.

Nárůst sepsí na odděleních stoupá se zvyšujícím se počtem náročných operací, transplantací a léčby nádorových onemocnění, u kterých je nezbytné použití katétrů a jiných umělohmotných pomůcek sloužících k léčbě. Nárůst sepsí můžeme také přisuzovat prodlužující se délce života obyvatelstva, protože u starších lidí je oslabená imunita a jsou k tomuto onemocnění náchylní.

Cévní katétrý se podílejí na vzniku sepe zhruba v 15 - 20%. V minulosti se na vzniku katéetrových sepsí podílely hlavně gramnegativní mikroorganismy, dnes je podíl gramnegativních a grampozitivních mikroorganismů podílejících se na vzniku sepe vyrovnaný. (Svoboda, 2004)

Z výše uvedených problémů které sebou sepe přináší, vyplývá nutnost hledat metody, které by urychlily diagnostiku sepe, zamezily ohrožení zdravotního stavu pacienta a snížily náklady na léčbu. Proto se hledají různé metody k rychlé diagnostice tohoto onemocnění.

Jednou z možností rychlé diagnostiky katéetrové sepe je využití hemokultivačních lahviček Bactec, které umožní získat předběžnou kvantitu mikroba již do 24 hodin.

Tato diplomová práce se zabývá tím, zda výsledky kvantity mikrobů získaných v hemokultivačních lahvičkách Bactec korelují s klinickým stavem pacienta.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Obecné pojmy

### 1.1.1 Definice bakteriémie

Je přítomnost bakterií v krvi bez klinické odezvy.

### 1.1.2 Definice sepse

Systémová zánětlivá reakce organismu na přítomnost infekce. Je to obranný mechanismus s cílem eliminace zdroje infekce a zabránění jejímu šíření. Za určitých okolností může dojít k zánětlivé reakci i na původně nepostížené orgány, která může vést až ke smrti. (Černý, 2002)

Její průběh se dělí na tři stádia:

- seps
- těžká seps
- septický šok

Jsou posuzovány především parametry klinické, které slouží k zařazení vývoje sepse do jednotlivých stadií. Z laboratorních parametrů jsou to leukocyty, Pa CO<sub>2</sub> a sledování dysfunkce orgánů. (Černý, 2002)

### 1.1.3 Septický šok

Je charakterizován hypotenzí nereagující na podávání tekutin a známkami orgánové hypoperfuze. (Černý, 2002)

### 1.1.4 MODS (Multiple Organ Dysfunction)

Organismus reaguje na primární inzult (v našem případě u sepse) vznikem a řetězením patologických změn u orgánu, které nebyly původně postiženy. K závažným projevům patří (ARDS-šoková plíce), poruchy hemodynamiky a hemokoagulace (DIC), porucha imunitního systému. Dojde k narušení homeostázy a celého orgánového systému. (Zima, 2002)

### 1.1.5 SIRS (Systematic Inflammatory Response Syndrom)

Zánětlivá odpověď organismu, která nemusí být výhradně infekčního původu. Jedná se o nespecifickou reakci organismu s aktivací cytokinů, hemodynamickými, metabolickými změnami. Vede k ní závažná infekce, šokové stavy s nekrotizací aj. K charakteristickým rysům patří změny tělesné teploty (horečka či hypotermie, tachykardie, změny počtu leukocytů (leukocytóza s nezralými formami nebo naopak leukopenie) a tachypnoe.

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

- teplota nad 38°C nebo pod 36°C
  - srdeční frekvence nad 90 tepů/min
  - tachypnoe s frekvencí nad 20/min nebo projevující se  $\text{Pa CO}_2 \leq 4,3 \text{ kPa}$  (32 mm Hg)
  - leukocytóza  $\geq 12 \cdot 10^9/l$  nebo  $\leq 4 \cdot 10^9/l$  nebo více než 10 % neutrofilů (tyček)
- (Zima, 2002)

### 1.1.6 Pojmy týkající se infekce centrálního žilního katétru

CVC – centrální venózní katetr (Central Venous Catheter)

CRB – bakteriémie související s katétre (catheter-related bacteremia), je definována přítomností tří kritérií:

- pozitivní kultivace katétru
- pozitivní kultivace z periferní krve odebrané před odstraněním katétru
- nález identického mikroorganismu v každé z výše uvedených kultur

BSI – infekce týkající se krevního řečiště (bloodstream infekcion)

CRS – sepse související s katétre (catheter-related sepsis)

CRS je definována jako pozitivní kultivace katétru, je-li katétr považován za zdroj pacientovy sepse, ale bakteriémie není přítomna. Někdy se používá termín infekce krve související s katétre a vztahuje se na případy, u nichž jsou pozitivní periferní hemokultury, kultivace konce katétru nesplňuje kritéria pozitivní kultivace, přesto je katétr zřejmě původcem infekce (dojde ke snížení teploty po odstranění katétru). (Černý, 2002)

## 1.2 Patofyziologie vzniku sepse

Velkou roli v patogenezi hrají receptory, jejichž aktivací je spuštěn proces patologického procesu. Receptory rozpoznávají průnik patogenních mikroorganismů.

Antigeny, které aktivují receptory na povrchu buněk:

- endotoxin G-bakterií = lipopolysacharid (LPS)
- součásti G+mikrobů (peptidoglykany, kys. teichoová)
- antigeny z buněčné stěny hub
- virové antigeny
- exotoxiny – toxin A

### 1.2.1 Systémová odpověď

Z bakterií uvolněný lipopolysacharid se váže na sérový protein LPB. Vzniká komplex, který pak zachytí molekula sCD14, která je umístěna na povrchu makrofágů. Bylo zjištěno, že tato molekula nemá funkci přenášet informaci dovnitř buňky. Tuto funkci mají Toll-like receptory (TLR).

TLR patří do rodiny receptorů, které mají rozhodující vliv na vyvolání zánětlivé odpovědi. Nejdůležitější je TLR4. Tento rozpoznávající systém je přítomen u savců, ale také u hmyzu i rostlin.

Toll-like receptory spouštějí intracelulární signální cesty. (Svoboda, 2004) Dochází k aktivaci fosfolipázy A2 a k aktivaci transkripce následované produkcí cytokinů (IL-1, IL-6, TNF, IL-8).

Hlavním prozánětlivým mediátorem je tumor necrosis faktor alfa, který je zřetelně zvýšen již za 30-90 minut. TNF-  $\alpha$  stimuluje uvolnění cytokinů, interleukinu (IL)-1, destičky aktivujícího faktoru (PAF), metabolitů kys. arachidonové, zvyšuje adhezi destiček a zvyšuje koagulaci, je zodpovědný za zvýšení teploty a způsobuje depresi myokardu.

Již po této fázi může pacient zemřít v důsledku oběhového selhání. Pacient však tuto fázi většinou přežije a dochází ke kompenzátorní protireakci v důsledku aktivace protizánětlivě působících látek – solubilních receptorů, antagonistů receptorů a protizánětlivých cytokinů, např. IL-4, IL-10, antagonistů receptorů a protizánětlivých cytokinů, IL-1, TGF- $\beta$  (transforming growth factor), kortizolu a adenosinu. ~~Tatážé~~

se nazývá kompenzační protizánětlivá reakce – CARS (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrom).

Na dalším průběhu sepse se podílí SIRS a CARS a stav je popisován jako MARS (Mixed Antagonisti Response Syndrome).

Cytokiny a chemokiny produkované makrofágy reagují s buňkami hostitele, které pak produkují silné sekundární prozánětlivé mediátory, např. MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor). Jeho nadměrnou stimulací dochází k vysoké aktivaci adhezivních molekul (ICAM) a reaktivních forem kyslíku.

Horečka je základní klinickou odpovědí organismu na infekci. Horečka vyvolává tvorbu heat shock proteinů (HSP), což je skupina bílkovin kritická pro přežití buněk během stresu. Proto se doporučuje nesnižovat unáhleně teplotu antipyretiky.

Původní zánětlivá odpověď na mikrobiální invazi je užitečná, mobilizuje obranu proti infekci a umožňuje hojení ran. Pokud jsou kontrolní mechanismy, které omezují odpověď organismu 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. (Svoboda, 2004).

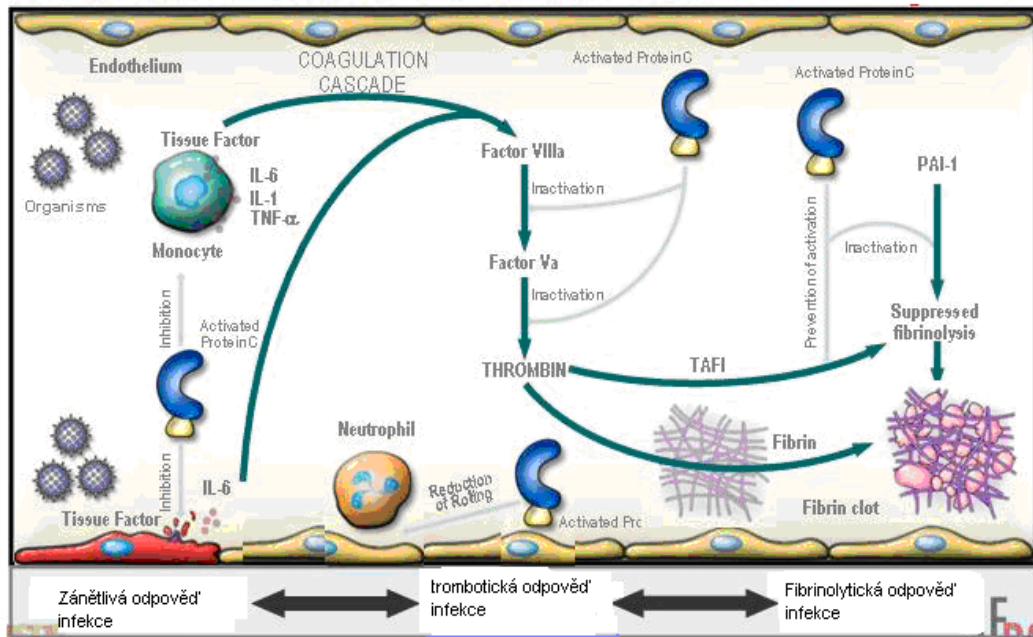
### **1.2.2 Kardiovaskulární změny**

Při sepsi dochází k periferní vazodilataci, sníží se cirkulující objem, sníží se výkonnost myokardu a dojde k poruchám perfúze v terminálním arteriolárním řečišti. Na periferní vazodilataci se podílejí mediátory zánětu. Viz výše.

Na endoteliální buňky působí prozánětlivé cytokiny, aktivují je a tím dochází k uvolňování tkáňového faktoru. Uvolňuje se také destičky aktivující faktor. Aktivované monocyty dále uvolňují inhibitor-1 aktivátoru plazminogenu (PAI-1), čímž dochází k inhibici fibrinolýzy.

U zdravých osob existují regulační mechanismy, které zabraňují generalizované koagulaci. Jde o inhibitor tkáňového faktoru (TFPI), aktivovaný protein C (APC) a antitrombin III (AT).

U sepsy dochází ke kontinuálnímu uvolňování tkáňového faktoru a dochází k inaktivaci těchto inhibitorů a inhibitory nejsou schopny zabránit generalizované diseminované koagulaci. Mikrotromby se pak šíří do vzdálených orgánů, vyvolávají jejich nefunkci a jsou v hlavní míře zodpovědné za MODS či MOF. Viz výše. (Svoboda, 2004).



Obr. 1 – Aktivace proteinu C u pacientů s těžkou sepsí (Rezende Enderlon, Dr, 2004).

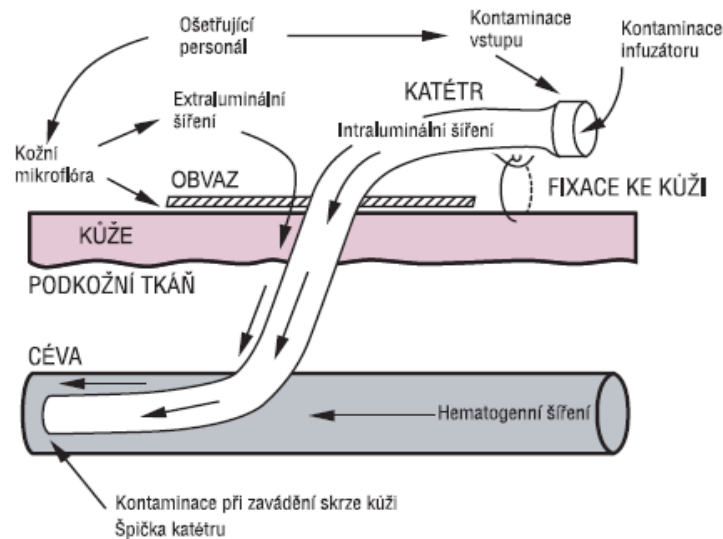
### 1.2.3 Klinický obraz

- febrilní stav/hypotermie
- tachykardie
- tachypnoe
- známky periferní vazodilatace
- rozvoj šoku
- změny mentálního stavu
- nízká systémová cévní rezistence/zvýšený srdeční výdej
- zvýšena spotřeba kyslíku
- leukocytóza/neutropenie
- laktátová acidóza
- abnormality ve vyšetření jaterních nebo ledvinných funkcí
- trombocytopenie

- zvýšena koncentrace prokalcitoninu
- zvýšena koncentrace C-reaktivního proteinu
- zvýšena koncentrace cytokinů (Černý, 2002)

### 1.3 Patogeneze katérové seapse

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 zavedených katétru. Na JIP je mnohonásobně častější kolonizace extraluminózní cestou. (Svoboda, 2004).



Obr. 2 – Kontaminace, kolonizace a infekce katétru (Drábková Jarmila, 2006)

#### 1.3.1 Dispozice vzniku seapse

- prodlužující se věk obyvatelstva
- zvýšené používání antibiotik
- léčba cytostatiky
- narkomanie
- HIV a AIDS
- narušení celistvosti kůže – katétry, u močových cest používání kanyl
- jiné implantáty z umělé hmoty
- popáleniny
- předčasně narozené děti, děti vůbec
- nozokomiální nákaza



### 1.3.2 Patogenní ukazatelé infekcí spojených s katétrem

#### Materiál katétrů a ovlivnění patogeneze

Studie provedené in vitro ukazují, že patogenezi katéetrové sepse ovlivňuje materiál katétru. Katétrů vyrobené z polyvinyl chloridu nebo polyethylenu jsou pravděpodobně více náchylné k adhezi mikroorganismu než katétrů vyrobené z teflonu, silikonových vláken nebo polyuretanu (Sheth 1983), (Ashkenazi 1986)

Určité materiály katétrů jsou více trombogenní, jde o vlastnost, která činí katétr náchylný ke kolonizaci a vytvoření infekce. (Locci,1981)

Velkou roli hrají i nepravidelnosti povrchů katétrů. *Koaguláza-negativní stafylokoky*, *Acinetobacter calcoaceticus* a *Pseudomonas aeruginosa* tyto povrchy vyhledávají

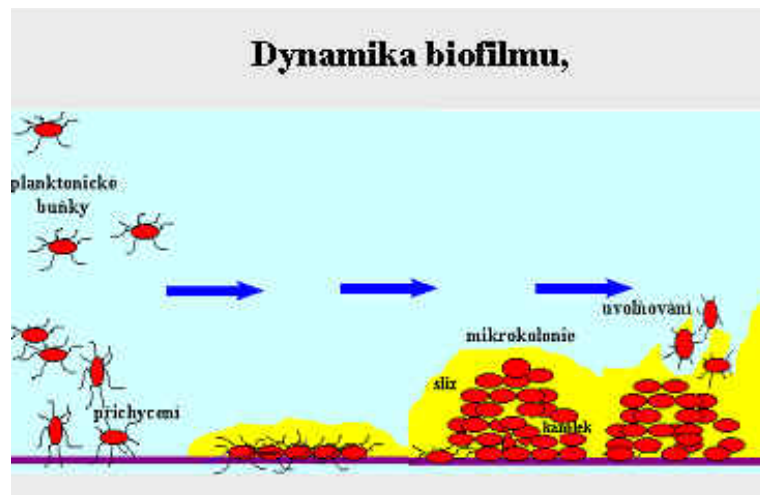
#### Adhezivní vlastnosti dány mikroorganismy

Adhezivní vlastnosti mikroorganismů k povrchu katétru hrají v patogenezi infekcí významnou roli. Např. *S.aureus* adhezuje na hostitelské bílkoviny (např.fibronektin), které jsou běžnou součástí materiálu katétru. Např. koaguláza-negativní stafylokoky adhezuji k polymerním povrchům mnohem rychleji než jiné patogeny. (Hermann, 1993), (Hermann, 1991)

### 1.3.3 Biofilm

Skoro všechny vložené cévní katétrů jsou osídleny mikroorganismy. Mikroorganismy tvoří na katétru tzv. biofilm. Biofilm je prokazatelný už po 24 hodinách. Biofilm tvoří buňky, bakterie a extracelulární matrix.

Následující obrázek popisuje nasedání volně přítomných bakterií na pevný povrch. Následně dochází k tomu, že bakterie začnou produkovat polymerní hmotu, která tvoří hustou síť, do které se pak zachytávají další bakterie, složky krevního oběhu a vytváří se hustá hmota, která může vyvolat vznik trombu.



Obr. 3 – Tvorba biofilmu v katétru (Drábková Jarmila, 2006)

Mezi patogeny které produkují substanci, která velmi dobře snáší umělohmotný povrch katétrů patří koaguláza – neg.stafylokoky. Koaguláza – neg.stafylokoky žijí přirozeně na kůži a mukózních membránách lidského těla. (Von Eiff C, et al., 2001)

Určité druhy koaguláza-neg.stafylokoků produkují extracelulární polysacharid často nazývány jako slime (sliz, hlen), který tvoří mezibuněčnou hmotu biofilmu. Vrstva biofilmu napomáhá nejen k adhezenci mikroorganismů, ale také k jejich udržení, ochraně před antibiotiky, fagocytujícími neutrofily, makrofágy a protilátkami. (Ludwicka, 1984), (Farber, 1990)

V přítomnosti katétru je tento sliz potenciálem pro patogenitu koaguláza - negativních stafylokoků, kteří tak odolávají hostitelským obraným mechanismům. (Gray, 1984)

Léčba koaguláza – negativních stafylokoků je obtížná vzhledem k jejich rezistenci na antibiotika.

### **Komunikační systém mezi baktériemi v biofilmu**

Mnohé studie se zabývají problematikou komunikace mezi baktériemi. Tento komunikační systém se nazývá quorum sensing systém (QS).

QS kontroluje expresi mnoha genů v závislosti na velikosti populace. Komunikace probíhá pomocí malých molekul zvaných autoinduktory. Gramnegativní bakterie používají acylované homoserinové laktony, grampozitivní komunikují pomocí oligopeptidů.

Jedná se o velmi nízké koncentrace látek (feromonů), které řídí derepresi regulačních genů, což vede ke stimulaci biofilmu.

Řízení tvorby biofilmu u stafylokoků je zprostředkováno dvěma systémy – *agr* a *luxS*. *Agr* (accessory gene regulator) je u *S.aureus* a *S.epidermidis* kódována *agr* operonem. Bylo prokázáno, že *S.aureus* produkuje feromony, které způsobují zvýšení transkripce.

U *S.epidermidis* je tvorba biofilmu regulována expresí autolysinu *AtlE* a delta-toxinu. Delta toxin má zkřížené účinky mezi jednotlivými druhy stafylokoků. Účinkuje v pozdějších stádiích tvorby biofilmu, kdy snižuje přilnavost bakterií na povrchu polystyrenu. Je zajímavé, že nepůsobí na primární přilnutí.

Druhý QS systém *luxS* byl nalezen u rozmanitých druhů gramnegativních i grampozitivních bakterií. Ovlivňuje transkripci *ica* operonu zodpovědného za produkci PIA (polysacharid intracelulární adhezín), který umožňuje adhezi množících se buněk mezi sebou.

*S. epidermidis* produkuje poly-gama-DL glutamovou kyselinu (PGA). PGA chrání bakterie před ochrannými mechanismy lidského těla tzn. (pH lidského potu, neutrofilní fagocyty). (Kocianova S, at al, 2005)

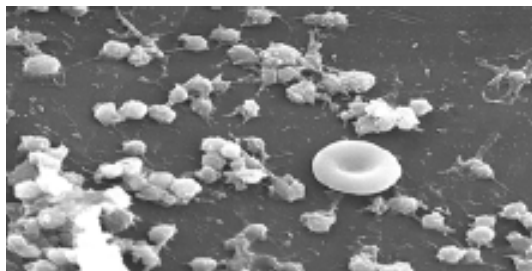
Podobné vlastnosti mají i určité druhy *Candida*. V přítomnosti roztoku obsahující glukózu tvoří sliz podobný tomu, který produkuje řada bakterií. Z toho je patrné, že infekce vzrůstá u pacientů přijímajících parentální výživu.(Branchini, 1994)

Adheze mikroorganismů na katérový povrch vyplývá ze vzájemného působení fyzikálních charakteristik katétru, jako jsou nepravidelnosti jeho povrchu, náboje molekul na povrchu katétru a hydrofobicity, která se týká povrchu bakterií.

Vliv quorum sensing systému na produkci biofilmu u *S.aureus* je předmětem mnoha studií.

Velká pozornost je věnována regulaci biofilmů. Biofilm způsobuje rezistenci k antibiotikům a obraným mechanismům makroorganismu. (Vadyvaloo V, 2005) To je způsobeno přenosem genů rezistence a virulence v prostředí o vysoké hustotě bakteriálních buněk. Antibiotická terapie infekcí způsobených původcem tvořících biofilm je z těchto důvodů problematická.

Regulace tvorby biofilmu by mohla být jednou z možných cest terapie katérové sepsy. Agr feromony jsou považovány za vedoucí látku pro vývoj protistafylokokové terapie.



Obr. 4 - Biofilm vytvořený za 24 hodin (Geffers Christine, 2006)  
(buňky, bakterie, extracelulární matrix)



Obr. 5 - Biofilm vytvořený na katétru za 2 dny (Schauwers Arno, 2006)

## **1.4 Typy intravaskulárních katetrů**

### **Netunelizovaný CVC**

Nejběžněji užívaný katétr, odpovídá za 90 % všech infekcí spojených s katétre. Vkládá se podkožně do centrální podklíčkové, krční nebo stehenní žíly.

### **Tunelizovaný CVC**

Jedná se o chirurgicky vložený CVC s tunelizovanou částí vystupující z kůže a dakronovou manžetou. Tato manžeta inhibuje migraci mikroorganismů v úseku katétru, užívá se u pacientů, kteří potřebují dlouhodobou chemoterapii, infuzní terapii aplikovanou doma nebo hemodialýzu.

### **Periferní venózní katétr**

Obvykle je vkládán do žíly na předloktí ruky, jedná se o nejčastěji užívaná intravaskulární zařízení.

### **Periferní arteriální katétr**

Je určen pro krátkodobé užívání, běžně se užívá pro monitorování hemodynamického stavu a ke stanovení krevních plynů u kriticky nemocných pacientů. Riziko infekce se blíží centrálnímu venóznímu katétru.

### **Středový katétr**

Periferní katétr (velikost 7,6 – 20,3 cm) je vkládán přes předloketní žílu do proximálních nebo hlavových žil, ale nevstupuje do centrální žíly. Je spojován s nižším počtem případů infekce než u centrálního venózního katétru.

### **Pulmonální arteriální katétr**

Vkládá se pomocí teflonového zavaděče a obvykle se ponechává na daném místě jen tři dny. Většina katetrů je opatřena heparinem k omezení vzniku katéetrové trombózy a mikrobiální přilnavosti ke katétru.

## **System k monitorování tlaku**

Užívá se ve spojení s arteriálním katétre. Je spojován s epidemickou a endemickou nosokomiální infekcí, zdrojem je často vodní sloupec v trubici mezi pacientovým intravaskulárním katétre a aparaturou k měření tlaku.

## **Periferní centrální katétr**

Poskytuje alternativní katetrizaci do podklíčkové žíly nebo jugulární žíly. Je vkládán přes periferní žílu do horní duté žíly, obvykle cestou mozkové nebo bazilární žíly. Je snadněji udržován a je u něj méně mechanických komplikací než u netunelizovaného CVC.

## **Totálně implantované zařízení**

Podkožní otvor nebo rezervoár se samouzavíracím septem pod kůží, je zpřístupněn pomocí jehly přes neporušenou kůží, je zde patrný nízký počet infekcí. Je vkládán do podklíčkové a krční žíly.

## **1.5 Původci katéetrových sepsí**

Zdrojem infekce katéetrových sepsí jsou nejčastěji komenzálové z vlastní kůže pacienta. Nebezpečí spočívá v tom, že patogenní nemocniční kmeny v mnoha případech nahradily normální kožní flóru pacienta. (Svoboda, 2004)

Při výskytu bakteriémie u nemocného se zavedeným centrálním žilním katétre závisí míra pravděpodobnosti přítomnosti katétru jako zdroje infekce významně na vykultivovaném mikroorganismu. K často nalézaným původcům NN patřil: *Staphylococcus aureus* (30%), *Pseudomonas aeruginosa* (29%), koaguláza-negativní stafylokoky (19%), kvasinky (17%), *Escherichia coli* (13%), enterokoky (12%), *Acinetobacter spp.* (9%) a *Klebsiella spp.* (8%), *Corinebacterium*, druh *Bacillus* a plísně, zvláště druh *Candida*. (Černý, 2002)

Projekt surveillance a kontroly epidemiologicky významných patogenů (SCOPE) ukázal, že 64% ze 10 617 případů nosokomiální bakteriémie bylo vyvoláno G+ koky, zatímco G- tyčky byly izolovány jen u 27% případů. (Vincent, 2003)

Z G+ bakterií mají významnou roli viridující streptokoky. Závažným problémem se staly streptokoky skupiny D, a to zejména enterokoky, které jsou často izolovány z hemokultur. (Landry, 1989)

Typ mikroorganismu	Podíl na celkovém výskytu infekce	Typ mikroorganismu	Podíl na celkovém výskytu infekce
PK neg. stafylokoky	60 – 70 %	<i>Enterococcus sp.</i>	2 – 4 %
<i>S. aureus</i>	5 – 15 %	<i>Pseudomonas sp.</i>	< 5 %
<i>Candida sp.</i>	5 – 10 %	MRSA (meticilin rezistentní <i>S. aureus</i> )	< 5 %
<i>Enterobacteriaceae</i> vč. <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Klebsiella sp.</i>	5 – 10 %	<i>Burkholderia sp.</i> <i>Malassezia sp.</i>	< 2 % < 2 %

Tab. 1 - Mikroorganismy zastoupené nejčastěji při katetrových hematogenních infekcích

### Rod *Staphylococcus*

Grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé a většinou neopouzdržené sférické koky. Vyskytují se jednotlivě nebo ve dvojicích (v klinickém materiálu) nebo v hroznících (v kulturách z kultivačních půd).

#### *Staphylococcus aureus*

Patří mezi koaguláza pozitivní stafylokoky. Normálně je nalézán na kůži, v nozofaryngu, v zažívacím traktu. Produkuje řadu extracelulárních metabolitů. Má tendenci vyvolávat tvorbu hnisavých abscesů. Je zdrojem nozokomiálních infekcí. Jsou známy rezistentní nemocniční kmeny. (Potužník, 1978)

### *Staphylococcus epidermidis*

Patří mezi koaguláza negativní stafylokoky. Lze ho běžně nalézt na kůži a na sliznicích jako součást fyziologické flóry. V nemocnicích způsobují katérové sepse. (Potužník,1978)

### **Rod Enterobacter**

Pohyblivá gramnegativní tyčka. Kolonie mají hlenovitý charakter. Tyto bakterie lze nalézt v dolní části zažívacího traktu. Patologicky se mohou uplatnit u infekcí močových cest.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Jedná se o gramnegativní aerobní tyčky.

Je u nich patrná značná odolnost k antimikrobním látkám, inertnost vůči některým dezinficiencím. Růstová nenáročnost a odolnost k zevnímu prostředí činí z tohoto mikroorganismu obávaný druh. Primárním ložiskem je obvykle urogenitální trakt, infekce kůže, ran a popáleniny.

### ***Klebsiella (K.pneumonie)***

Klebsiely jsou nepohyblivé gramnegativní tyčky většinou výrazně opouzdřené polysacharidovým pouzdrem.

Jde vesměs o opouzdřené, růstově nenáročné bakterie. *K.pneumonie* je přítomna normálně v zažívacím traktu člověka. Za patologický podmínek se s ní setkáváme u infekcí močových a dýchacích cest. Jsou také zdrojem nozokomiálních nákaz pro jejich vysokou rezistenci.

### ***Serratia marcescens***

Jde o malé gramnegativní pohyblivé tyčky, bohatě rozšířené v přírodě, zejména půdě, vodě a potravinách. Za fyziologických podmínek bývá nalézán v zažívacím traktu. Mezi vlivy umožňující patogenní uplatnění patří chronická a těžká onemocnění.

### **Kvasinky**

Osídlují kůži a sliznice zdravých lidí. Predilekční místa pro taková osídlení jsou hlavně sliznice horních a dolních zažívacích cest, horních dýchacích cest, vagíny a fossa



navicularis penis. Příčinami patogenního uplatnění je lokální poškození epitelu a obecná imunodeficience. Nemoc se také manifestuje u těžce nemocných lidí.

Z třiceti druhů kvasinek je přibližně osm podmíněně patogenních: *C.albicans*, *tropicalis*, *pseudotropicalis*, *parapsilosis*, *krusei*. Léčba se liší od bakteriémie.

## **1.6 Diagnostika katérových sepsí**

Diagnostika je založena na klinických a laboratorních kritériích. Klinické vyšetření je při určení diagnózy infekcí spojených s katetrizací nespolehlivé. Důvodem je jeho nízká specifita a senzitivita. Například horečka (s nebo bez zimnice), která je považována za jeden z nejcitlivějších klinických ukazatelů, má velmi slabou specifitu.

K potvrzení diagnostiky katérové sepse existuje několik laboratorních metod.

### **1.6.1 Kultivační techniky krve**

#### **Periferní krevní kultury**

Průkaz periferní bakteriémie je jedním z hlavních vyšetření v diagnóze katérové sepse.

Při odběru krve na vyšetření hemokultur je velice důležité správné načasování odběru. Nejvyšší množství bakterií se nalézá v krvi asi jednu hodinu mezi naměřenou teplotou a třesavkou.

Pokud nepátráme přímo po infekci v centrálním katétru, je vhodnější použít čerstvý žilní vpich, protože při odběru krve z centrálního žilního katétru bývá krev kontaminována kožní flórou a bakteriemi kolonizující katétru. Místo vpichu má být dvakrát potřeno jodovým roztokem nebo 70% izopropylalkoholem a jehlu je nutné vyměnit (a tedy použít jinou) před vstříknutím krve do odběrové baňky. K tomu, aby byl odběr úspěšný, je nutné, aby v baňce byly alespoň 3 CFU. Koncentrace patogenů se často pohybuje mezi 0,1 - 1 mikroorganismem v 1 ml. Při odběru jedné hemokultury je tedy nutné odebrat ke kultivaci dvakrát až třikrát 10 ml krve. Odběr více jak 30 ml již nezlepšuje přesnost diagnostiky. U větších dětí se odebírá 5 ml, u malých dětí 1- 2,5 ml. U novorozenců stačí 1 ml, či dokonce méně. (Svoboda, 2004)

Endoluminální kolonizace CVC tvoří biofilm, který obsahuje nasedající a planktonickou formu bakterií. Tato kolonizace se pak dostává do infuzních roztoků a následně do systémové cirkulace. Proto se infuzní proudění před odběrem krve nezastavuje.

### **Kvantitativní hemokultura z katétru**

Test je založen na poznatku, že koncentrace bakterií v krvi, odebrané z infikovaného centrálního katétru, je mnohem vyšší než koncentrace z čerstvého vpichu z periferní žíly. Zvýšení se udává od 4násobku do 30násobku. Jako prahová hodnota se obvykle uvádí poměr 5:1.

Touto metodou je možno detekovat pouze mikroorganismy, které se nacházejí uvnitř katétru a je tedy vhodná spíše pro dlouhodobě zavedené katétrů.

Tato metoda je poměrně velmi specifická (94-100% specifčnost), i když její senzitivita je poněkud nižší (80%).

Metoda má i své nevýhody. Je poměrně těžkopádná, vyžaduje dobrou funkci katétru, je také značně nákladná. (Svoboda, 2004)

Kvantitativní zpracování krve je možné některou z následujících metod:

### **Tekutá misková technika**

Tato technika kvantitativní hemokultury zahrnuje smísení krve a tekutého agaru. Pak se tato směs nalije na Petriho misku. Po kultivaci se zjišťuje počet kolonií narostlých v agaru.

### **Rozptylová misková technika**

Rozptylová misková technika zahrnuje rozlití krve přes povrch agaru a následné počítání kolonií po kultivaci.

Obě metody mají nevýhodu, je nutné použít méně než 1ml krve na desku a je potřeba velkého počtu desek k jednomu vyšetření. Potřebujeme okolo 10 desek pro přesnou analýzu.

### **Lyzová centrifugační technika dle Dorna (1976)**

Tato metoda je založena na centrifugaci bakterií z hemolyzované krve do roztoku o vysoké denzitě. Tento roztok je pak s bakteriemi nanášen na běžné kultivační půdy. (Potužník, 1978)

Tato technika je navržena k maximální detekci nízkého množství bakterií nebo funginémie a odstranění inhibičních faktorů, jakými jsou antibiotika, které mohou být přítomny v krvi. Tato metoda umožňuje izolaci širokého množství mikroorganismů oproti bujónové metodě. Je možné použít libovolné kultivační půdy a identifikovat vzácné patogeny (např. bordetely). Na tomto principu pracuje komerčně vyráběný hemokultivační systém ISOLATR (Oxoid, GB). V České republice nebyl tento systém zatím použit. (Dobbins, 1999)

## **1.6.2 Kultivační techniky špičky CVC**

### **Kvalitativní kultivace dle Druskina a Siegele (1963)**

Jedná se o ponoření katéetrové špičky do bujónu. Jasnou nevýhodou této metody je vysoký počet falešně pozitivních výsledků. (Dobbins, 1999)

### **Kvantitativní kultivace dle Seligmana**

Seligman první navrhl kvantitativní kultivaci špičky katétru. Techniky diagnostiky mikroorganismů a kultivace katétru byly v dalších letech upraveny tak, aby se zlepšila senzitivita a specifčnost testu. Proplachování špičky katétru, důkladné míchání, sonizace a třepání, dále kombinace sonizace a třepání byly popisovány jako metody uvolnění mikroorganismů z biofilmu katétru. Prahové hodnoty pro tyto různé techniky kolísají mezi 100 a 1000 cfu/ml. (Dobbins, 1999)

### **Semikvantitativní kultivace dle Makiho (1977)**

Maki popsal kultivaci katétru, která se stala standardní metodou pro analýzu CVC pro příštích 20 let. Tato metoda nabízí jednoduchou, nenákladnou a zdánlivě přesnou metodu katéetrové kultivace. V této technice se bere jako vzorek vnější povrch ze špičky katétru. Metoda spočívá v rolování segmentu katétru po povrchu agarové půdy.

Asi 15 CFU je považováno za pozitivní bakteriální množství. Ačkoli Maki sám potvrdil vyšší hodnotu až 1000 CFU jako přesnou hodnotu udávající katérovou sepsi. Byla provedena studie, kdy bylo testováno 13 vzorků od pacientů mající sepsi a pouze 4 ze 13 byly pozitivní. To ukazuje na nízkou specifickou metodu. Makiho rolovací technika a kultivace špičky jsou náchylné na kontaminaci.

### **Cleriho metoda**

Cleri a spol. (1980) použili postupné vyplachování katérového lumen kultivačním bujonem. Hraniční hodnotu indikující vznik katérové infekce stanovil na 1000 CFU/ml.

### **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 specifickou 88% pro diagnózu katérové infekce a 100% senzitivitu a specifiku pro diagnózu katérové bakteriémie.

### **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).

### **Metoda Linarésové**

V roce 1985 Linarésová popsala metodu, která je modifikací Cleriho kvantitativní metody. Propláchla vnitřní povrch katétru 2ml kultivačního média, které potom mnohonásobně zředila a stanovila endoluminální kolonizaci katétru. Následně byl katétr kultivován metodou dle 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 katérových infekcí. (Cleni et al.,1980, Sadoyama et al.,2003)

## **Endoluminální brush**

Byl poprvé popsán Grabem a Jakobsenem v roce 1983, kteří použily kovový bodec, který vložili do lumina katétru. Technika byla později vylepšena použitím endoluminálního kartáčku

Metoda se provádí tak, že se zavede sterilní kartáček lumenem katétru a posunuje se katétre. Pak se kartáček vyndá, odstříhne se a společně s adherovaným biofilmem je třepán v 1 ml fosfátového pufru a následně je kvantitativně kultivován. 100 CFU je považováno za počet prokazující sepsi. Endoluminální brush jako metoda má 95% senzitivitu a 84% specifčnost. (Dobbins, 1999)

Velkou výhodou této metody je, že umožňuje vyšetření katétru bez nutnosti jeho vytažení. Ovšem při zavádění kartáčku do katétru může způsobit bakteriémi. (Tighe et al., 1996)

### **1.6.3 Další metody kultivace CVC**

#### **Párová kultivace krve z CVC a krve z periferní žíly**

Porovnávají se časy, během kterých bakterie vyrostou v automatických hemokultivačních systémech. Pokud se změří časový rozdíl mezi pozitivitou kultivace z CVC a z periferní žíly ( za předpokladu, že se vypěstuje z obou stejná kultura) a zvolí se pro pozitivitu metody časový rozdíl 120 minut, je senzitivita i specifčnost této metody pro diagnózu CRI přes 90 %. (Svoboda, 2004)

#### **Kvantitativní kultura z místa vpichu**

U krátkodobě používaných katétru, vzniká kontaminace častěji extraluminózní cestou. Superficiální kultivace jsou metody, které semikvantitativně hodnotí stěr z místa vpichu nebo z prvního podkožního centimetru zavedeného ( a povytaženého) katétru. Pokud se bere jako prahová hodnota rozmezí 15 – 50 CFU/ml pro kulturu získanou z místa vstupu, vykazuje metoda velkou senzitivitu v rozpoznání kolonizace. Ne každá kolonizace je doprovázena rozvinutou CRI, takže postup nemá velký smysl, pokud pacienti nemají současně hnisavou sekreci z místa vstupu nebo známky tromboflebitidy. Metoda však má velkou hodnotu ve vyloučení diagnózy CRI. Pokud je výsledek kultivace z kožního stěru z místa vstupu negativní, je CRI v podstatě vyloučena a je tedy možné ponechat zavedený katétr bez výměny. (Svoboda, 2004)

## 1.6.4 Rychlé diagnostické techniky

### Akridin oranže leukocyte cytospin (AOLC) test

Po centrifugaci se provádí barvení buněk akridinovou oranží. Vyžaduje jen nepatrné množství krve (0,05 ml) odebrané z lumen CVC, vyšetření je pro laboratoř velmi jednoduché a výsledek je k dispozici za 30 minut. Autoři udávají senzitivitu i specifčnost tohoto vyšetření přes 90 %. Nicméně dosavadní studie nepřinesly zatím výsledky, které by mohly být podkladem jednoznačného doporučení metody. Metoda neřeší problém, kdy vyměnit CVC. (Svoboda, 2004)

### Elektronová mikroskopie

Skannovací elektronová mikroskopie je užívána k prozkoumávání nejrůznějších povrchů např. ke zkoumání katérové kolonizace. Raad a spol. prozkoumávali extraluminální a endoluminální povrchy CVC pomocí semikvantitativní metody elektronové mikroskopie. Prohlédli a prozkoumali mikrobiální kolonizaci CVC zahrnujících 39 případů pozitivní katérové sepsy a 26 kulturně negativních kontrol. Rozsah biofilmu byl větší na endoluminálních površích než na extraluminálních. (U katétru získaných pre mortem). Rozsah biofilmu na extracelulárních površích zůstává nezměněn s rostoucí dobou použití katétru, endoluminální biofilm roste s časem. CVC odstraněné post mortem měly větší extraluminální kolonizaci než katétry odstraněné pre mortem. Pravděpodobné vysvětlení může být takové, že se endoluminální biofilm poškodí, při odšťihání celé aparatury u odstraňování CVC. (Raad et al., 1993)

### Nová metodika FISH (fluorescenční hybridizace in situ) v mikrobiologické diagnostice sepsí

Pozitivní hemokultury v systému BacT/Alert 3D jsou na základě klasické mikroskopie hybridizovány navíc s DNA sondami značenými fluorescenčním barvivem FITC nebo Cy3, které reagují se specifickým úsekem na rRNA bakterie či kvasinky. Metoda umožní do tří hodin předběžnou druhovou diagnostiku tak důležitých původců sepsí, jako je *S.aureus*, *S.agalactiae*, *E.faecalis*, *E.faecium*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *S.maltophilia* a *B.cepacia*. Tato metoda umožní takto vymezit i široké skupiny bakterií – *Enterobacteriaceae*, stafylokoky, streptokoky a enterokoky.

## 1.7 Automatizované hemokultivační systémy

### 1.7.1 Systém Bactec 9120

Jde o nepřetržitě pracující automatické přístroje. Tyto přístroje mohou zrychlit diagnózu bakteriémie. Systém je nazýván jako nepřetržitý monitorovací systém, protože je možno lahvičky doplňovat každých deset minut a 24 hodin denně. Lahvičky se doplňují do přístroje tehdy, pokud přístroj neprovádí kontrolu lahviček.

Automatizované systémy udávají u každé pozitivní hemokultury TTD (time to detection), tedy dobu v hodinách uplynulou do vyhodnocení positivity. TTD závisí na druhu mikroorganismu a na jeho množství v odebrané krvi. U nádobek inokulovaných vysokou koncentrací CFU je rychlejší detekce než u nižších koncentrací. Hodnota TTD tedy může poukázat na množství mikroorganismů ve vzorku, ale nelze jí použít k přesnému určení etiologického agens.

#### Princip systému Bactec

Bactec je automatizovaný hemokultivační systém umožňující detekci růstu mikroorganismů během inkubace. Diagnostika růstu mikroorganismů, u poslední verze systému Bactec řady 9120, je založena na fluorescenčním průkazu tvorby  $\text{CO}_2$ , který se v hemokultivační nádobce hromadí jako produkt metabolismu bakterií. Přístroj je trvale připojen k počítači, který v intervalech 10 min vydává impulsy k zapojení detekčního systému. Na dně hemokultivační nádoby je senzitivní vrstva oddělená od média membránou. Tato membrána propouští pouze  $\text{CO}_2$ , který je produkován mikroorganismy během růstu. Ten v senzitivní vrstvě reaguje s vodou za vzniku  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , dochází tak k místnímu poklesu pH. Každých 10 minut je k této vrstvě vyslán světelný paprsek určité vlnové délky. Senzitivní vrstva se aktivuje a následně dochází k vyzáření světla a návratu vrstvy do původního stavu. Množství a kvalita vyzářeného světla závisí na pH, detektor tak vlastně nepřímo měří tvorbu  $\text{CO}_2$  v nádobce.

Nádoby jsou kultivovány při  $35^\circ\text{C}$  a jsou pravidelně protřepávány. Pozitivní nález přístroj hlásí zvukovým a optickým signálem.

Starší verze systému Bactec detekovaly tvorbu  $\text{CO}_2$  fotometricky v oblasti infračerveného záření. První přístroj Bactec byl založen na radiometrickém stanovení, kultivační médium obsahovalo glukózu se značeným uhlíkem  $^{14}\text{C}$ . Pak byla měřena tvorba radioaktivního  $\text{CO}_2$ , který vznikal metabolickou činností bakterií.

### Kapacita:

V přístroji může být najednou umístěno 120 (Bactec 9120), 240 (Bactec 9240), 50 (Bactec 9050) hemokultivačních nádobek.

### Software systému:

U systému Bactec má každý blok s celami svůj mikropočítač, kde se veškerá data shromažďují a ihned vyhodnocují. Do stolního počítače tak putují jen výsledky. Mikropočítač má omezenou kapacitu paměti, proto se veškerá data z paměti po týdnu vymazávají. Počítač tedy představuje pouze spojku mezi hemokultivačním systémem a LIS. Výsledkem je lepší komunikace a obsluha.

## **Hemokultivační nádoby:**

Pro Bactec řady 9120 lze použít následující typy:

### Nádoby BACTEC Standard Aerobic/F

Standardní aerobní nádoby obsahují 25ml tekuté půdy na bázi sojového kaseinového hydrolyzátu s přídavkem heminu, manadionu, SDS, glukózy, pyridoxinu, kvasničného extraktu. Plynnou fází tvoří vzduch obohacený CO<sub>2</sub>. V nádobce je podtlak umožňující nasátí 5-10ml krve. Používají se k detekci a získání aerobních mikroorganismů z krevních vzorků.

### Nádoby BACTEC Standard Anaerobic/F

Nádoby obsahují 25ml 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 CO<sub>2</sub> a dusíku. Opět je zde podtlak umožňující nasátí 5-10ml krve. Používají se k detekci a získání anaerobních mikroorganismů z krevních vzorků.

### Nádoby BACTEC PLUS Aerobic/F

Nádoby obsahují 25ml tekuté půdy na bázi sojového kaseinového hydrolyzátu s přídavkem heminu, manadionu, glukózy, pyridoxinu, kvasničného extraktu a SDS. Navíc obsahují 16% neionogenních adsorpčních přísad (RESIN = kuličky sorpční pryskyřice) a 1% kationtově-výměnných přísad (katex), které jsou určeny k inaktivaci antibiotik a baktericidně působících složek krve a k inhibici hemokoagulace. Plynnou



fázi tvoří vzduch obohacený o CO<sub>2</sub>. V nádobce je podtlak, který umožňuje nasát 8-10ml krve.

Média obsahující přísady inaktivující antibiotika vykazují vyšší záchyt klinicky významných mikroorganismů. Především u stafylokoků a streptokoků došlo ke zkrácení detekčního času (Spaargaren, 1998).

#### Nádobky BACTEC PLUS Anaerobic/F

Nádobky obsahují 25ml tekuté půdy, která je (oproti aerobní nádobce) obohacena o savčí tkáňový lyzát, fruktózu, arginin, thioly (L-cystein), citrát sodný a fosfát draselný. Opět navíc obsahují 16% neionogenních adsorpčních přísad (RESIN) a 1% kationtově-výměnných přísad (katex). Plynná fáze je tvořena směsí CO<sub>2</sub> a dusíku. Je zde podtlak umožňující nasátí 8-10ml krve. Používají se k detekci a získání anaerobních mikroorganismů (bakterií a kvasinek) z krevních vzorků.

#### Nádobky BACTEC MYCO/F LYTIC

Obsahují 40ml tekuté půdy, která je obohacena (oproti standardní aerobní nádobce) o saponin (lyzační činidlo). Plynnou fází tvoří vzduch s přídavkem CO<sub>2</sub>. Injekuje se 1 – 5ml krve (Waite, 1998). Nádobky jsou určeny pro detekci kvasinek, hub a mykobakterií z krve nebo jiných tělních tekutin. Používají se často pro diagnostiku infekcí krevního řečiště u pacientů s AIDS.

Vyvinutím tohoto média se čas detekce kvasinek ve srovnání s použitím BACTEC PLUS Aerobic/F média snížil z 74-57h na 29-14h (Frickem, 1998).

#### Nádobky BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F

Nádobky obsahují 40ml tekuté půdy s SPS a saponinem. Plynná fáze je tvořena směsí CO<sub>2</sub> a dusíku. Injekuje se 3 – 10 ml krve.

Toto médium vykazuje u pacientů bez antibiotické terapie vyšší záchyt klinicky významných mikroorganismů než PLUS Aerobic/F médium (Rohner, 1997).

#### Nádobky BACTEC Peds Plus/F

Nádobky obsahují 40ml tekuté půdy, která je obohacena (oproti PLUS Aerobic/F nádobce) o savčí tkáňový lyzát a pyruvát sodný, 10% neionogenních adsorpčních přísad (RESIN) a 1% kationtově-výměnných přísad. Plynné prostředí tvoří vzduch s přídavkem CO<sub>2</sub>. Tyto nádobky jsou určeny pro objem krve 1 – 3ml (Rohner, 1999),

(Beneš, 1995). Používají se k detekci a získání aerobních mikroorganismů (převážně bakterií a hub) z pediatrických či jiných krevních vzorků, jejichž objem je menší než 3ml.

#### Nádobky BACTEC Mycosis IC/F

Médium obsahuje tobramycin a chloramphenicol, které potlačují bakteriální růst. Další součástí média je saponin, který se podílí na uvolňování fagocytárních hub a kvasinek z leukocytů. Injikuje se 8 – 10 ml krve. Nádobky se používají pro selektivní detekci a získání hub či kvasinek z krevních vzorků. Jsou určeny především pro imunosupresované neutropenické pacienty.

Správná volba kultivační nádobky je nutným předpokladem úspěšného záchytu patogenního agens.

### **1.7.2 BacT/Alert**

Hemokultivační systém BacT/Alert (Organon Teknika Corp., Durham, N.C., USA) byl představen v roce 1990. Různé studie prokazují, že BacT/Alert je plně srovnatelný s jinými hemokultivačními systémy, co se týká rychlosti detekce a výtěžku.

Jedná se o plně automatický hemokultivační systém zahrnující vlastní přístroj ovládaný počítačem a kultivační nádobky. 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.

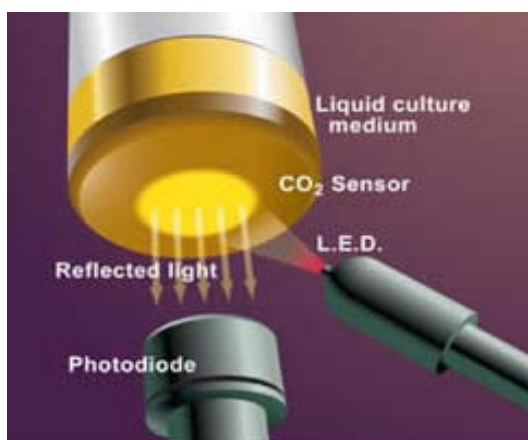
#### **Princip systému BacT/Alert:**

Po vložení nádobky do detekční jednotky systému je k senzoru exponován svazek červeného světla pomocí diody vysílající tenký paprsek (LED = light – emitting diode).

Odražené světlo je kontinuálně soustředěno k fotodiodě vestavěné v každé cele a transferováno na signál, který je před odesláním zesílen.

Za přítomnosti a následném množení mikroorganismů je metabolizován substrát kultivačního média. Přítomnost CO<sub>2</sub> produkovaného rostoucími mikroby je monitorována pomocí kolorimetrického senzoru přítomného v každé kultivační lahvičce. Výsledkem je změna barvy indikátoru (z tmavě zelené na žlutou). Tento

proces je kontinuálně a neinvazivně monitorován v každé cele. Přístrojem je detekována i nepatrná změna barvy senzoru.



Obr. 6 - Princip hemokultivačního systému Bact/Alert (Propagační materiály, 2006)

Komplex algoritmů využívá tři principy detekce:

1. První princip rozlišuje akceleraci CO<sub>2</sub> produkovaného mikroorganismy.
2. Druhá metoda hodnotí vysoký stupeň změny produkce CO<sub>2</sub> v závislosti na čase.
3. Třetí princip detekuje počáteční úroveň hladiny CO<sub>2</sub>. Pozitivita či negativita vzorků je určována pomocí rozhodovacího programu.

Jednotlivé vzorky jsou automaticky monitorovány a vyhodnocovány každých 10 minut. Výsledky jsou písemně, zvukově a světelně signalizovány. Ovládací systém shromažďuje a analyzuje data přijata z počítače a zpracovává je v informačních databázích. Pro každou nádobku je vyhodnocen tvar růstové křivky tvorby CO<sub>2</sub> v čase. Inkubace probíhá při 35 – 37 °C. Každý vzorek je identifikován čárovým kódem umístěným na firemním štítku nádobek. Neinvazivní technologie účinně eliminuje případnou sekundární kontaminaci vzorku.

#### Kapacita:

Databázová jednotka je schopna monitorovat více skříní. Jeden přístroj může být obsazen 120 (respektive 240) lahvičkami. Celkem lze systémem detekovat až 1440 nádobek.

### Software systému:

Software systému BacT/Alert vytváří dvousměrnou spojkou mezi laboratorním informačním systémem (LIS) a vlastním hemokultivačním systémem. Pacientova data jsou tak automaticky získávána a výsledky mohou být rychle odeslány ze systému BacT/Alert do LIS. Tím je umožněna centralizace výsledků. Těchto několik kroků umožňuje zefektivnit technologii, což vede ke zmenšení pravděpodobnosti vzniku chyby. V ČR dosud nerealizováno.

### **Hemokultivační nádobky:**

Rychlost záchytu jednotlivých mikroorganismů závisí do značné míry na složení kultivačních médií obsažených v nádobkách.

#### Nádobky BacT/ALERT SA (Standard Aerobic)

Nádobky 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). Nádobky jsou připraveny pod vakuem v atmosféře CO<sub>2</sub> a vzduchu. Injikuje se 5 – 10ml krve. Používají se k získání a detekci aerobních mikroorganismů ve vzorcích krve a jiných tělních tekutin, odebraných pacientům podezřelých z bakteriémie či fungémie.

#### Nádobky BacT/ALERT SN (Standard Anaerobic)

Tyto nádobky 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). Nádobky jsou připraveny pod vakuem v atmosféře CO<sub>2</sub> a dusíku. Po inokulaci 5 – 10ml krve se nádobky nesmějí odvzdušňovat (Scharfen, 1995). Používají se k získání a detekci anaerobních mikroorganismů ve vzorcích krve a jiných tělních tekutin odebraných pacientům podezřelých z bakteriémie či fungémie.

#### Nádobky BacT/ALERT FA (FAN Aerobic)

Nádobky obsahují 30ml 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. Používají se k získání a detekci aerobních mikroorganismů ve vzorcích krve a jiných tělních tekutin, odebraných pacientům podezřelých z bakteriémie či fungémie. Tyto nádobky se jeví jako citlivější než nádobky typu BacT/ALERT SA. Nádobky tohoto typu jsou ve srovnání s dříve vyráběnými nádobkami označovanými typu FAN kvalitnější v záchytu *Burkholderia cepacia* a kvasinek, zejména *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans*. Pro ostatní klinicky významné mikroorganismy jsou srovnatelné (Mirrett, 2001).

#### Nádobky BacT/ALERT FN (FAN Anaerobic)

Obsahují 40ml kultivačního média o stejném složení jako nádobky typu BacT/ALERT FA. Nádobky jsou připraveny pod vakuem v atmosféře dusíku. Používají se k získání a detekci anaerobních mikroorganismů ve vzorcích krve a jiných tělních tekutin, odebraných pacientům podezřelých ze septikémie.

#### Nádobky BacT/ALERT PF (Pediatric FAN)

Médium obsahuje 20ml mozko-srdcové infuze s heminem, menadionem a pyridoxinem. Jako antikoagulans je použit 0,02% SPS. Atmosféru tvoří směs CO<sub>2</sub> s dusíkem. Dle doporučení výrobce se odebírá minimálně 0,5ml krve, maximálně však 4ml krve. Malý objem je ideální pro použití v pediatrii nebo pro pacienty v těžkém stavu.

#### Nádobky BacT/ALERT MP (Mycobacteria Process)

Nádobky obsahují 10ml suplementovaného bujónu. Používají se k získání a detekci mykobakterií ze sterilních tělních tekutin (kromě krve). Jsou navrženy pro objem vzorku 0,5ml. Při jejich použití je nutné mít k dispozici také nádobky typu BacT/ALERT MAS obsahují suplement nutný pro kultivaci mykobakterií. Tyto nádobky se kultivují v přístroji MB/Bact, který je odlišný od ostatních přístrojů BacT/Alert. Doba kultivace je 42 dní, nádobky se netřepou a měření je prováděno každou hodinu.

#### Nádobky BacT/ALERT MAS (Mycobacterial Antibiotic Supplement)

Jedná se o médium o následujícím složení: kyselina olejová, glycerol, hovězí sérový albumin, amarant a voda. Důležitou součástí jsou lyofilizovaná antibiotika, konkrétně amphotericin B, azlocillin, polymyxin B, trimethoprim, kyselina nalidoxová

a vankomycin. Nádobky tohoto typu se používají tak, že 0,5ml jejich kultivačního média přidáme do každé nádobky BacT/ALERT MP.

#### Nádobky BacT/ALERT MB (Mycobacteria Blood)

Nádobky obsahují 29ml tekuté půdy obohacené o SPS a glycerol. Používají se k detekci a získání mykobakterií z krevních vzorků. Jsou navrženy pro objem 3 – 5ml krve. Při jejich použití je nutné mít k dispozici také nádobky MB/BacT.

#### Nádobky MB/BacT (Enrichment Fluid)

Nádobky obsahují hovězí sérový albumin, chlorid sodný, kyselinu olejovou, saponin a vodu. Používají se ve spojení s nádobkami BacT/ALERT MB, do kterých se přidává 1,0ml kultivačního média tohoto typu.

Firma bioMérieux přichází na trh s dalšími novinkami. Jednou z nich jsou hemokultivační nádobky systému BacT/ALERT vyrobené z plastu. Nové plastické nádobky obsahují kultivační média o shodném složení, jsou však o 30% lehčí než klasické skleněné nádobky. Tím dochází k výraznému snížení nákladů souvisejících s jejich odstraňováním.

### **1.7.3 Výhody a nevýhody automatizovaných hemokultivačních systémů**

Bactec firmy Becton Dickinson patří spolu se systémem BacT/Alert (Organon Technika) k nejvíce rozšířeným systémům v České republice. Oba systémy pracují na podobném principu a mají srovnatelné výsledky. Oproti manuálním systémům mají automatizované hemokultivační systémy značné výhody, ale i své nevýhody a požadavky, které lze shrnout takto:

Výhody:

- hlavní výhoda - úspora práce a materiálů potřebných k vyočkování slepých subkultur.
- další významná přednost spočívá ve zkrácení doby detekce pozitivních nálezů, což může být pro pacienty v těžkém stavu životně důležité.
- vykazují vyšší počet izolovaných patogenních mikroorganismů než při standardních způsobech zpracování.

Nevýhody:

Primární nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístroje. V případě Bactecu činí cca 1 300 000 Kč. Koupě přístroje se tedy vyplatí tam, kde množství odebíraných hemokultur je velké (více než 3000 – 5000 ročně) a kde jsou nemocní skutečně závislí na rychlé mikrobiologické diagnostice. Jedná se především o oddělení, která se zabývají léčbou neutropenických pacientů (onkologická pracoviště, transplantační centra) a oddělení popáleninové medicíny.

Požadavky:

- každodenní provoz mikrobiologického oddělení. V ideálním případě provoz nepřetržitý, neboť přístroj může začít signalizovat pozitivitu v kterémkoli okamžiku.
- trvalý a úzký kontakt mezi klinikem a mikrobiologem.
- speciálně vyškolený personál. Při odběru krve na kultivaci je třeba klást zvláště velký důraz na dodržení pravidla asepse. Při nedodržení narůstá počet kontaminací, ke kterým jsou nádoby obou systémů náchylné.

#### **1.7.4 Hygiena a ochranné prostředky**

Důležité je dodržovat hygienu rukou. To znamená dezinfekci rukou před palpací žíly, při manipulaci s katérovým zařízením, při výměně nebo převazování katétru. Při práci nosit také pro vlastní ochranu rukavice. Při práci s centrálním venózním katétreem nosit sterilní rukavice, při práci s periferním venózním katétreem stačí jednorázové rukavice.

Nezbytné je také nosit pláště a roušky při práci s katétreem a dodržovat správnou hygienu a dezinfekci na oddělení. (Gefferes et al, 2006)

Sherertz a spol. prokázal pokles kanylových sepsí ze 4,51 na 2,92 případů na 1000 katérových dnů ( $p < 0,01$ ) za 18 měsíců po zorganizování jednodenního školení o sterilních postupech při zavádění centrální cévky do žíly. Raad aj. referoval o výrazném poklesu infekcí z 12 na 4,  $p=0,03$  po tom, co cévky byly zaváděny za maximálně sterilních podmínek, proti zavádění jen s použitím sterilních rukavic a malého krytí. (Vincent, 2003)

### 1.7.5 Dezinfekce místa vpichu

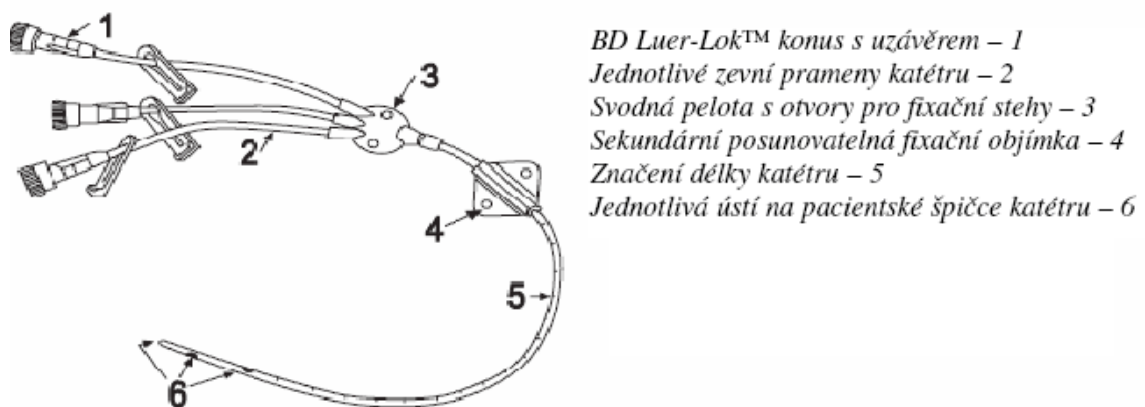
Mezi hlavní dezinfekční přípravky patří alkohol (70% etanol, 1-propanol 60-70%, 2-Propranol 40-60%). Dále jsou to roztoky obsahující jód.

### 1.7.6 Volba místa vpichu

Riziko infekce je největší tam, kde je nejkoncentrovanější kožní flóra, a nezávisí na druhu čištění kůže. Nejmenší kolonizaci místa vpichu mají katétry subklaviální (4,5%), naopak největší kolonizaci mají katétry femorální (19,8%). Riziko infekce jugulárních katétru je uprostřed. Femorální katétry mají také ze všech aplikačních míst nejvyšší riziko trombózy.

Volbou místa vpichu jsou z hlediska infekce subklaviální katétry.

V 95% případů se katétr snadno zavede na první nebo druhý vpich. Při potížích zavedení katétru se nezavádí déle než pět minut, tzn. 3 až 4 vpichy, popřípadě je možno se pokusit dvakrát o punkci artérie. Obtížné zavedení katétru s mnoha pokusy je totiž spojeno s podstatně větším počtem infekčních i neinfekčních komplikací. Již při zavádění prvního katétru je dobré odhadnout, zda vystačíme s jednoluminózním, nebo zda je vhodné volit ihned katétr s více cestami. Víceluminózní katétr je obviňován z většího výskytu kontaminace.



Obr. 7 - Schéma víceramenného katétru s třemi prameny a luminy (Drábková, 2001)



### 1.7.7 Tunelizovaný katétre

Riziko infekce je možné snížit použitím tunelizovaných katétru (po určitou vzdálenost od vstupu do žíly je katétre veden pod kůží).

Byla provedena studie, kdy byly porovnány různé typy katétru v tom, jak jednotlivě ovlivňují vznik infekce. Výsledky byly hodnoceny na 100 intravenózních dnů (%) a 1000 intravenózních dnů (%).

Periferní intravenózní katétre (0,1%, 0,5 na 1000 intravenózních dnů), střednicový katétre (0,4%, 0,2 na 1000 intravenózních dnů), vyšší hodnoty byly u katétru bez manžety a bez antimikrobiálního potahu (4,4%, 2,7 na 1000 intravenózních dnů), arteriální katétre užívaný pro monitorování hemodynamiky (0,8%, 1,7 na 1000 intravenózních dnů) a periferně vložený centrální katétre (2,4%, 2,1 na 1000 intravenózních dnů). Chirurgicky vložená dlouhodobá centrální venózní zařízení jako je tunelizovaný katétre (22,5%, 1,6 na 1000 intravenózních dnů) a centrální venózní vstupy (3,6%, 0,1 na 1000 intravenózních dnů). Porovnáním jednotlivých katétru na 100 intravenózních dnů je riziko katéetrové sepse vyšší, než při porovnání katétru na 1000 intravenózních dnů.

Ze studie je patrné, že užití tunelizovaného katétru a katétru s manžetou je lepší, než užívání netunelizovaných, nemanžetových katétru a katétru s antimikrobním potahem.

### 1.7.8 Počet a délka zavedení katétru

Riziko vzniku infekce spojené s katétre je u prvního zavedeného katétru nižší než u každého dalšího katétru. Riziko se zvyšuje, pokud je katétre zaveden déle než 1 týden a dále pokud je používán k parenterální výživě. (Maki et al, 2006)

#### Katétre s upraveným povrchem

U vysoce rizikových pacientů (zejména s rozsáhlými traumaty s perforací střev, s popáleninami) je nutné zvážit použití nově vyvinutých katétru z antiadhezivních biomateriálů, katétru povlečených antibiotikem nebo obsahujících ionty stříbra. Katétre s ionty stříbra mohou snížit vznik infekce o polovinu až o 70%, ale tato výhoda se ztrácí, pokud jsou použity pro výživu. Podobných výsledků bylo dosaženo s katétre potaženými chlorhexidinem/sulfadiazinem stříbra. Ještě lepších výsledků bylo dosaženo s katétre impregnovanými dvěma antibiotiky minocyklinem a rifampicinem.

Současné směrnice říkají, že katétr s antimikrobiálním povlakem se mají použít u pacientů, kteří jej budou potřebovat déle než 4 dny.(Svoboda 2002)

### **1.7.9 Školení personálu**

Hraje v prevenci vzniku infekce dominantní roli. Je důležité pravidelné doškolení sester a lékařů. Bylo prokázáno, že výchova sester dokázala snížit frekvenci primárních infekcí krevního proudu z 10,8 na 3,7 na 1000 dní zavedeného katétru. (Svoboda 2002)

## **1.8 Terapeutická doporučení**

Antimikrobiální léčba musí být v případech těžké sepse nebo septického šoku zahájena ihned současně s odstraněním katétru. Pokud musíme volit antibiotikum naslepo, závisí výběr zejména na místní situaci, to se týká spektra nozokomiální flóry a její rezistence na antibiotika.

### **1.8.1 Technika antibiotického zámku**

Jde o techniku, kdy se katétr uzavře a naplní se roztokem antibiotika. Tak se vytvoří časový úsek, který je potřebný k tomu, aby došlo ke zničení biofilmu v lumen katétru. Pro zničení biofilmu je potřeba až 100x větší koncentrace antibiotika než pro bakterie žijící volně v roztoku. Odpadá zde problém systémové toxicity a je uchráněno mnoho katétru od předčasného vytáhnutí. Tato metoda se začíná na klinickém pracovištích uplatňovat stále častěji. Uplatňuje se u pacientů bez komplikací jako jsou (orgánová hypotenze nebo hypoperfúze, septická trombóza a septická embolie).

Byla provedena studie k vytvoření optimálního roztoku antibiotika do antibiotické zátky. Byla zkoumána směs minocyclinu, EDTA, a 25% etanolu, samostatně nebo v kombinaci, proti patogenům, meticilin – rezistentním bakteriím *S. aureus* a *C. parapsilosis*, kteří způsobují septické stavy spojené s katétrem a jsou často přítomny v biofilmu, který se vyskytuje v lumen katétru.

Kombinace minocyklinu-EDTA (M-EDTA) v 25% etanolu je roztokem, který je schopný kompletně eradikovat *S. aureus* a *C. parapsilosis* v biofilmu. Vedle toho, M-EDTA ve 25% etanolu byl mnohem účinnější v eradikaci růstu meticilin-rezistentního *S. aurea* a *C. parapsilosis* v porovnání s roztoky EDTA, M-EDTA, 25% etanolu

a EDTA v etanolu. Předpokládá se, že M-EDTA ve 25% etanolu je mnohem účinnější v eradikaci *S.aureus* a *C.parapsilosis* přítomných v biofilmu katétru.

### **Výhody a nevýhody antibiotického zámku**

Výhody:

- podávají se vysoké koncentrace antibiotik a odpadá systémová toxicita
- nízká cena
- snadné poskytnutí
- vhodné i pro domácí terapii

Nevýhody:

- nízká aktivita proti mikroorganismům na vzdálených místech
- možné zpoždění v léčbě, pokud antibiotický zámek selže

(Carratalá, 2002)

## **1.8.2 Terapeutická doporučení týkající se nejčastějších mikrobu způsobující katéetrovou sepsi**

### **Koaguláza negativní stafylokoky**

V léčbě se uplatňuje vankomycin, je možná změna k semisyntetickému penicilínu, pokud je izolát citlivý. Kombinace vankomicinu a gentamicinu není doporučována pro běžnou terapii.

Pokud je CVC odstraněn, odpovídající systémová léčba antibiotiky je doporučována po 5 – 7 dnů. Pokud je netunelizovaný CVC uchován na místě a intraluminální infekce je prokázána, systémová léčba antibiotiky je doporučována po dobu 10 - 14 dnů.

U tunelizovaného katétru, v případě prokázané bakteriémie, může být katétr udržován pouze v tom případě, je-li to nezbytné a pacient musí být léčen systematickou antibiotickou terapii po 7 dnů a dále je léčba doplněna o antibiotickou zátoku po dobu 14 dnů.

Léčba selhává pokud je trvale prokázána teplota a je pozitivní hemokultura. Návrat infekce po podání antibiotik je jasným důkazem pro vyjmutí katétru.

### ***Styphylococcus aureus***

Lékem první volby při prokázání bakteriémie způsobené mikroorganismem

*S.aureus* jsou beta-laktámová antibiotika pro parenterální užití. U pacientů s alergií na penicilín bez anafylaktické reakce a angioedému může být použita první generace cefalosporinů (jako je cefazolin) bez alergické reakce v 90% případů. U pacientů s vážnou alergií na beta-laktámová antibiotika a při výskytu methicilin rezistentní bakterie *S.aureus* je vankomicin lékem volby.

Vankomicin by neměl být užíván pokud je diagnostikován *S.aureus* citlivý k beta-laktámovým antibiotikům. Nadměrné užívání vankomicinu vede k tvorbě mikroorganismů rezistentních na vankomicin.

Netunelizovaný CVC u kterého byla prokázána přítomnost *S.aureus*, by měl být odstraněn a nový katétr by měl být umístěn na jiné místo.

Tunelizovaný CVC s prokázanou intraluminální infekcí, ale bez komplikací může být odstraněn a nebo ponechán na místě s adekvátní systematickou antibiotickou terapií a užitím antibiotického zámku po dobu 14 dnů.

### **Gram-negativní bakterie**

U pacientů (s netunelizovaným katétre a prokázanou bakteriemií gram-negativními bakteriemi, u kterých nebyla evidována septická trombóza nebo endokarditida) by měl být odstraněn katétr a měla by být nasazena účinná terapie.

Chinolony (jako je ciprofloxacin s nebo bez rifampicinu) jsou preferovány, protože mohou být podávány perorálně.

### ***Candida albicans* a jiné houby**

Všichni pacienti s potvrzenou kandidémií musí být léčeni. Amfotericin B je doporučován u pacientů, kteří jsou hemodynamicky nestabilní nebo kteří podstoupili dlouhodobou léčbu flukonazolem.

Pacienti, kteří jsou hemodynamicky stabilní a kteří mají citlivé bakterie na flukonazol, mohou být léčeni flukonazolem místo amfotericinu B.

Průběh léčby kandidémie by měl trvat okolo 14 dní po poslední pozitivní hemokultuře. *Candida krusei* by měla být léčena amfotericinem B. Při diagnóze kandidémie by měl být tunelizovaný katétr odstraněn.

Léčení katéetrové infekce vyvolané patogenem *Malassezia furfur* je pomocí amfotericinu B.

## 2 PRAKTICKÁ ČÁST

### 2.1 Laboratorní pomůcky

- Skleněné zkumavky
- Sterilní fyziologický roztok 4 ml
- Injekční stříkačky 5 nebo 10 ml
- Jehly
- Buničina
- Stojan na zkumavky
- Třepačka Vortex Genie 2
- Budík
- Popisovač
- Dezinfekce-roztok lihobenzinu
- Rukavice
- Hemokultivační přístroj Bactec 9240, Becton Dickinson, USA
- Hemokultivační lahvičky Bactec Standard Aerobic
- Laminární box

### 2.2 Postup práce

Po příchodu vzorku do laboratoře se zkumavce s katétrem nebo kanylou přiřadí číslo vzorku a toto číslo se napíše na hemokultivační lahvičku.

Celá laboratorní práce se provádí v laminárním boxu, aby nedošlo ke zkontaminování vzorku.

Nejprve se z hemokultivační nádoby odstraní víčko a očistí se vstup do lahvičky lihobenzinem, z důvodů odstranění možných mikroorganismů.

Do zkumavky se přidají 4ml fyziologického roztoku. Zkumavku se třepe 2 minuty na třepačce. Po dvou minutách třepání se odsaje tekutina ze zkumavky do injekční stříkačky (5 nebo 10 ml). Pak se celý obsah vstříkne přes gumové septum do hemokultivační nádoby.

Použitá zkumavka se vzorkem se vyhodí do koše s infekčním odpadem, injekční stříkačka do určeného pevného kontejneru.

Hemokultivační zkumavky se kultivují v přístroji Bactec 9240. Do počítače, který je k přístroji připojen se napíše jméno pacienta, rodné číslo, číslo vzorku a čárový kód z lahvičky. Celá průvodka se musí uložit.

Lahvička se kultivuje do doby, kdy přístroj buď registruje růst mikroba a hlásí pozitivní hemokulturu a nebo se nechají lahvičky kultivovat 48 hodin. Pokud nedojde k registraci mikroba je vzorek považován za negativní.

Pokud se jedná o pozitivní vzorek, provede se identifikace mikroba pomocí mikroskopie a s použitím identifikačních setů BBL CRYSTAL™. Podle délky TTD a druhu mikroba zjistíme z předem určených rovnic přesnou kvantitu mikroba.

Z kultivace jednotlivých mikrobů v lahvičkách Bactec byly stanoveny k orientační kvantitě v řádech  $10^1$  -  $10^6$  časy TTD. Vytvořila se tak orientační tabulka jednotlivých mikrobů, podle které jsme jednotlivých časům přiřadily orientační kvantitu daného mikroba.

Následně byl zkonzultován stav pacienta s ošetřujícím lékařem a porovnán s výsledky, kterých bylo dosaženo v laboratoři. Otázka zněla, zda se jedná u pacienta o katérovou sepsi či nikoli, s ohledem na výsledky z laboratoře a na klinický stav pacienta.

### **Rovnice pro počítání kvantity (Čermák et al.2004)**

Tyto rovnice slouží pro přesné stanovení kvantity mikroba, který byl vykultivován v lahvičkách Bactec. Za „y“ se dosazuje TTD, počítáme hodnotu „x“.

#### Bactec Standard Aerobic

<i>E.coli</i>	$y = -1,3607\ln x + 18,982$
<i>K.pneumonie</i>	$y = -1,3133\ln x + 19,407$
<i>K.oxytoca</i>	$y = -1,3934\ln x + 17,203$
<i>E.cloacae</i>	$y = -1,8173\ln x + 23,767$
<i>Serratia marcescens</i>	$y = -0,5568\ln x + 13,023$
Kvasinky	$y = -1,9951\ln x + 32,984$
PK-negat.stafylokoky	$y = -3,1936\ln x + 29,727$

<i>Str.sanguis</i> ( $\alpha$ -hemol.str.)	$y = -2,3484\ln x + 37,981$
<i>S.aureus</i>	$y = -1,2211\ln x + 16,367$
<i>S.epidermidis</i>	$y = -1,9001\ln x + 36,098$
Enterokoky	$y = -0,5925\ln x + 13,078$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$y = -3,6517\ln x + 38,431$

### 2.3 Zpracování výsledků

Tato kapitola se zabývá vyhodnocením dat získaných z kultivace katétru. Vyhodnocení výsledků je provedeno z tabulky uvedené v příloze.

Výsledky byly vyhodnoceny formou kontingenční tabulky tab. 3, která porovnává výsledky kultivace katétru s klinickým stavem pacienta a vyjadřuje falešně pozitivní, falešně negativní vzorky.

Z této tabulky byla vytvořena tabulka vyjadřující celkovou korelaci klinického stavu s kultivací katétrů.

Dále byly kultivované katétrů porovnány s krevními kulturami, ale jen v těch případech kde byl odebrán katétr a zároveň krevní kultura. (tab. 6)

V této práci byla považována kvantita  $10^3$  mikrobů za kritérium pro diagnostiku katérové sepse. Tabulka 5 vyjadřuje mikroby a jejich kvantitu v případech, kdy byl klinikem vyhodnocen stav jako pozitivní nebo negativní. Tyto kvantity ukazují, že ne vždy musí hodnota  $10^3$  signalizovat diagnózu katérové sepse. V mnoha případech byly hodnoty nižší a klinický stav byl pozitivní, nebo naopak byly hodnoty vysoké a klinický stav byl negativní.

Vyjádření shody výsledku kultivace s klinickým stavem pacienta ze 194 testovaných vzorků.

	korelace metody	
pozitivní	12	75,00%
negativní	160	89,90%
suma	172	88,66%

Tab. 2 - Celková shoda výsledků kultivace s klinickým stavem pacienta katérové sepse

		cévní katétr - kvantita								SUMA
		pozitivní +		negativní –						
		≥ 1000 CFU	0 CFU	1-1000 CFU		SUMA				
Klinická korelace	pozitivní +	12	6,2%			4	2,1%	4	2,1%	16
	negativní –	18	9,3%	106	54,6%	54	27,8%	160	82,5%	178
SUMA		30	15,5%	106		58	29,9%	164	84,5%	194

Tab. 3 – Kontingenční tabulka, vyjádření falešně pozitivních a falešně negativních vzorků



## Vyjádření diagnostické senzitivity a specifčnosti metody

### Diagnostická senzitivita (citlivost) metody

$$\text{Senzitivita} = \text{SP} / (\text{SP} + \text{FN})$$

$$\text{Senzitivita} = 12 / (12 + 4) = 0,75 \quad \rightarrow \mathbf{75,00\%}$$

### Diagnostická specifčnost metody

$$\text{Specifčnost} = \text{SN} / (\text{SN} + \text{FP})$$

$$\text{Specifčnost} = 160 / (160 + 18) = \quad \rightarrow \mathbf{89,90\%}$$

Zastoupení jednotlivých mikrobů přítomných na testovaných katétrech u pozitivních vzorků. Rozdělení na gram pozitivní a gram negativní bakterie je uvedeno v následující tabulce.

	Mikrob	Klinický stav pozitivní (Počty vzorků)
<b>G –</b>	<i>K.pneumonie</i>	5
	<i>Serratia marcesceni</i>	3
	<i>Acinetobacter</i>	1
<b>G +</b>	PK neg.stafylokoky	2
	<i>S.epidermidis</i>	3
	<i>E.faecalis</i>	1
	<i>S.saprophyticus</i>	1

Tab. 4 - Vykultivované mikroby z katétru, které byly původci prokázané

Vyjádření kvantity u klinických významných stavů. Ukázka obtížnosti stanovit hraniční hodnotu charakteristickou pro vznik sepse. V této diplomové práci byla považována za hraniční hodnotu pro vyhodnocení katéetrové sepse kvantita  $10^3$  mikrobů. (viz. tab. 5 na následující straně)

Číslo materiálu	Vy kultivovaný mikrob	Množství vy kultivovaného mikroba	
		Klinický stav pozitivní	Klinický stav negativní
1983	<i>K.pneumonie</i>	298693	
1984	<i>K.pneumonie</i>	20788	
1544	<i>K.pneumonie</i>	124432	
1914	<i>K.pneumonie</i>	1393	
1621	<i>K.pneumonie</i>	12481	
1965	<i>K.pneumonie</i>		4499
1810	<i>K.pneumonie</i>		2054
1893	<i>Serratia marcescens</i>	87612471	
1074	<i>Serratia marcescens</i>	26777943	
1075	<i>Serratia marcescens</i>	93	
1298	<i>E.fecalis</i>	94	
1541	PK.neg:staf.	316,54	
1005	PK.neg:staf.	763	
1789	PK.neg:staf.		497
1622	<i>St.saprophyticus</i>	1675	
1860	<i>St.epidermidis</i>	1625	
1091	<i>St.epidermidis</i>	109491	
1090	<i>St.epidermidis</i>	76956	
1087	<i>St.epidermidis</i>		7282
1320	<i>St.epidermidis</i>		10145
1346	<i>St.epidermidis</i>		49983
1543	<i>St.epidermidis</i>		1003769
1167	<i>St.epidermidis</i>		19079
1168	<i>St.epidermidis</i>		1236
1406	<i>St.epidermidis</i>		9882
1408	<i>Acinetobacter</i>	691451	
1511	<i>Acinetobacter</i>		2159
1270	<i>Enterobacter</i>		15523
1709	<i>α-hemolyt.strep.</i>		6221
1770	<i>St.aureus</i>		3101
1348	<i>K.oxytoca</i>		512
1416	<i>Ps.aeruginosa</i>		454
1955	<i>St.hemol.</i>		151,7
1954	<i>St.hemol.</i>		35,9
1956	<i>St.hemol.</i>		47,5
1409	<i>St.hemol.</i>		2072

Tab. 5 – Vyjádření kvantity mikrobů u pozitivního a negativního klinického stavu. Znázornění obtížnosti vytvořit hraniční hodnotu pro jednoznačné určení katérové sepse.

Vykultivované katétry byly porovnány s krevní kultivací, porovnáno bylo 59 vzorků.

hemokultury							
klinika pozitivní				klinika negativní			
katétra pozitivní		katétra negativní		katétra pozitivní		Katétra negativní	
hem.poz.	hem.neg.	hem.poz.	hem.neg.	hem.poz.	hem.neg.	hemo.poz	hem.neg.
4	0	1	1	2	2	5	44

Tab. 6 – Porovnání výsledků krevní kultivace s kultivací katétru v závislosti na klinickém stavu pacienta

	korelace metod	
pozitivní	4	6,8%
negativní	44	74,6%
suma	48	81,4%

Tab. 7 – Korelace krevní kultivace s kultivací katétru ve vztahu ke klinickému stavu pacienta.

### Shrnutí výsledků:

Bylo zpracováno 194 cévních katétrů. U 30 (15,5%) katétrů byl pozitivní výsledek kultivace. V 88,66% případů byla zjištěna shoda výsledků kultivace katétru s klinickým stavem pacienta. V 12 (6,2%) případech byla klinicky i kultivačně diagnostikována pozitivní katérová sepe.

Falešná negativita byla 2,1% (4) a falešná pozitivita 9,3% (18). (viz. tab. 3)

Nejčastěji detekovaným mikroblem byly koaguláza negativní stafylokoky a nejčastějším mikroblem u kterého byla diagnostikována katérová sepe byla *K.pneumonie*. Výskyt G+ a G- mikrobů byl vyrovnaný. (viz. tab. 4)

Při porovnání metody kultivace katétru s krevní kultivací byla shoda výsledku kultivace katétru a krevní kultivace s ohledem ke stavu pacienta v 48 (81,4%) případech z 56 porovnávaných vzorků. (viz. tab. 7)

### 3 DISKUSE

Vstup do cévního – žilního řečiště patří k základním – prioritním výkonům prováděných na nemocničních odděleních.

Katetrizace a kanylace jsou důležité pro monitorování životních funkcí v lidském těle, ale je to také přístup živin a farmakologických preparátů přímo do krevního řečiště.

Zavedení kanyl a katétrů je spojeno s řadou problémů. Jedná se o zavedení cizího tělesa do organismu a tím dochází k porušení bariéry lidského těla.

Přestože je povrch katétrů upravován řadou technik, které mají omezit kolonizaci katétrů, úplná eradikace kolonizace je zatím nemožná. A proto jsou katétrů a kanyly zdrojem infekce pro organismus. U pacientů s vážným onemocněním může tato infekce zkomplikovat léčbu, ohrozit ho na životě, ale jsou zde i ekonomické aspekty, které zvyšují výdaje za léčbu prodlužováním hospitalizace pacienta.

Cílem této práce bylo posoudit, zda metoda kultivace katétru v hemokultivačních lahvičkách je přínosem pro klinické použití v diagnostice katéetrové sepsy a zda vykultivovaný mikrob a jeho kvantita koreluje s klinickým stavem pacienta.

Při zjištění TTD u daného mikroba byly dosazovány předem přibližné hodnoty specifické pro daného mikroba v řádech  $10^1$ - $10^6$ . Je ovšem mnohem lepší si hned přesnou kvantitu mikroba vypočítat z rovnice, která byla odvozena za předpokladu, že růst mikroba je exponenciální funkce.

Konzultovány s lékařem byly jen hodnoty patologicky vysoké, ale v závěru se ukázalo, že po přesném přepočtu kvantity mikrobů by bylo pacientů mnohem více a stálo by za to, tyto výsledky konzultovat s lékařem, protože určitá kvantita mikroba nemůže přesně posoudit přítomnost katéetrové sepsy. Záleží na mnoha okolnostech jako je stav imunitního systému pacienta, přítomnost jiného onemocnění atd. Proto je nutná komunikace lékaře s laboratoří.

Cleri stanovil hraniční hodnotu na 1000 CFU/ml metodou postupného výplachu lumen katétru.

Brun-Buisson stanovil hraniční hodnotu na 100 CFU/ml. Vložil segment katétru do zkumavky s 1 ml sterilní destilované vody a důkladně protřepal.

V této práci byla stanovena hraniční hodnota 1000 CFU. Metoda zpracování katétru se v této práci nejvíce podobala metodě Brun-Buissonově metodě, kde byla stanovena hodnota 100 CFU/ml.

V této práci byla prokázána katéetrová seps v několika případech již od hodnoty 100 CFU.

U mikrobů, které jsou součástí flóry kůže např. *S.epidermidis* je možné říci, že o katéetrové sepsi můžeme mluvit, pokud jsou hodnoty vyšší než  $10^3$ , ale u mikrobů které považujeme za patogeny s větší virulencí můžeme říci, že je třeba konzultovat každý pozitivní nález, protože může významně ovlivnit zdravotní stav pacienta. Včasné oznámení o výsledku klinikovi, může předejít vážným komplikacím.

Nejčastějším mikrobem u kterého byla prokázána katéetrová seps byla *K.pneumonie*. Tento patogen patří do skupiny gramnegativních mikroorganismů. Ale i přesto můžeme vyčíst, že podíl mikroorganismů grampozitivních a gramnegativních podílejících se na diagnóze seps je skoro vyrovnaný.(viz. tab. 4)

Z celkového množství 194 vyšetřených katéetrů se nejvíce objevovaly PK-neg.stafylokokoky, aniž by musely prokazovat septický stav. Patří mezi grampozitivní bakterie, které jsou známé svou rezistencí k antibiotikům. Produkuje extracelulární polysacharid nazývaný jako slime (sliz, hlen), který tvoří mezibuněčnou hmotu biofilmu.Velmi dobře snáší povrch katétru. Patří mezi nemocniční flóru. Výskyt patogenů tohoto mikroba může být způsoben kontaminací během zavádění, proto je jeho přítomnost často prokazována.

PK-neg.stafylokokoky mají mechanismy, které umožňují tvořit kvalitní biofilm, který je odolný proti obranným mechanismům hostitele. Je to způsobeno tvorbou poly-gama-DL glutamovou kyselinu (PGA). (Kocianova S, at al, 2005)

Velkou roli hraje také genetická výbava daného patogena. Schopnost tvořit kvalitní biofilm na umělohmotných površích je způsobena ica R genem, který je schopny produkovat polysacharid intracelulární adhesin. (Cafiso V, et al., 2004)

V této práci byla prokázána katéetrová seps v 16 přídech ze 194 katéetrů. Tak malý počet pozitivních vzorků je způsoben zřejmě tím, že na vyšetření se posílají všechny katéetry (s podezřením na katéetrovou sepsi, i ty které byly vytaženy při ukončení léčby), proto jsou některé katéetry vyšetřovány zbytečně. Je to starý zvyk některých oddělení posílat všechny katéetry i ty, které byly z pacientova těla odstraněny při odchodu

z nemocnice. Z těchto důvodů jsme se zaměřili pouze na katétry mikrobiologicky pozitivní.

V této práci se objevily případy, kdy hodnoty vykultivovaných mikrobů byly vysoké, ale klinik nám nemohl přesně určit diagnózu, zda jde o katérovou sepsi či nikoliv. U pacientů byla stanovena jiná diagnóza, nebo šlo o pacienta s jinými vážnými komplikacemi. Katétr byl v tomto případě zaslán na vyšetření jen z důvodu jeho výměny nebo preventivně. V takových případech může klinikovi výsledek kultivace pomoci v léčbě pacienta.

Při porovnávání výsledků krevní hemokultury s kultivací katétru ve vztahu ke klinickému stavu byl problém ten, že ne s každým katétrem byla odebrána krevní kultura, to souvisí se zasíláním všech katétrů na vyšetření. Vyhodnocení proto nebylo provedeno u všech katétrů. Správně by se měl na kultivaci posílat katétr spolu s odebranou krevní kulturou. Jedině kombinace vyšetření krevní kultury a kultivace katétru mohou jednoznačně prokázat přítomnost katérové sepse.

Z pohledu pozitivního klinického stavu vyšla ve většině případů shoda výsledků. V jednom případě došlo k neshodě, krevní kultivace byla negativní. Tato neshoda mohla vzniknout z této příčiny:.

- Krevní kultivace byla odebrána 3 dny před vynětím katétru, takže masivní kolonizace do krevního oběhu ještě nemusela nastat, protože jde o PK-neg.stafylokoky, které vytvářejí pevný biofilm.

V případě negativního klinického stavu byly případy, kdy byl katétr pozitivní a krevní kultivace negativní nebo pozitivní. Lišili se i mikrobi, kteří byli vykultivováni na katétru a v krevní kultuře, nebo byl katétr negativní a krevní kultivace pozitivní. Tyto případy mohly vzniknout z několika příčin: (Viz. příloha I)

- V těle byly přítomny dvě ohniska bakteriémie.
- Může jít o kolonizaci, která zde byla zanesena při vkládání katétru.
- Místem, kde je katétr zaveden. Bylo prokázáno, že podkličková 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.
- Zavedením katétru. Obtížné zavádění katétru a opakované pokusy jsou spojeny s vyšším výskytem infekce.

- Počtem lumen katétrů. Víceluminální katétrů mohou být spojeny s vyšším rizikem infekce v porovnání s jednoluminálními katétrů (nejspíše z důvodu častější manipulace s katétrů). Použitím centrálního žilního katétrů pro parenterální výživu je spojeno s vyšším výskytem kolonizace.
- Dobou zavedení katétrů. Riziko spojení se zavedením centrálního žilního katétrů stoupá při zavedení delším než jeden týden.

Použití hemokultivačního systému Bactec má oproti jiným metodám řadu výhod. Je to metoda rychlá. Rychlejší diagnostika snižuje výskyt septického šoku a zvyšuje šanci na přežití. Kombinace faktorů jakými jsou ( zlepšení pracovních postupů odběrů a snadná manipulace s lahvičkami) vede ke snížení rizika kontaminace.

Lze říci, že používáním hemokultivačního systému Bactec je oproti jiným vyšetřovacím metodám používaných k vyšetřování katérových sepsí velkým přínosem pro rychlost vyšetření, záchytem mikroba již od velmi nízké kvantity a dobrou manipulaci s lahvičkami. Hemokultivační systémy jsou pro oddělení nákladná záležitost, jak svým pořízením, tak provozem, ale jsou prospěšné v diagnostice onemocnění, které se s náročnějšími operacemi na odděleních vyskytují a ohrožují pacienta na životě.

## 4 ZÁVĚR

Tato práce se zabývá problematikou, zda výsledky kultivace katéetrové sepse korelují se zdravotním stavem pacienta.

Hlavní náplní práce bylo správné zpracování katétru a posouzení výsledné kultivace mikroba získaného z katétru s klinickým stavem pacienta. Výsledky, které ukazovaly vysokou hladinu mikroba nebo přítomnost patogenního mikroba, byly hlášeny ošetřujícímu lékaři a byla jim pokládána otázka, zda se u pacienta projevují známky katéetrové sepse.

V našem případě byla stanovena hraniční hodnota  $10^3$  mikrobů jako hraniční hodnota k posouzení, zda jde o katéetrovou sepsi, či nikoliv.

Při vyšetření 194 katéetrů bylo zjištěno, že nelze stanovit jednoznačnou kvantitativní hodnotu počtu mikrobů v případě stanovení jednoznačné diagnózy katéetrové sepse. Kvantitu mikroba je dobré porovnat s druhem vykultivovaného mikroba. U mikrobů s větší patogenitou byly zjištěny nízké hodnoty i v případě pozitivní katéetrové sepse.

Výsledky, které vykazují vysokou kvantitu mikroba nebo jde o záchyt patogenního mikroba musí být hlášeny ošetřujícímu lékaři.

Při určení správné diagnózy katéetrové sepse je dobré kombinovat výsledky kultivace katétru s krevní kultivací.

Práce s hemokultivačním systémem Bactec má řadu výhod. Především je to jeho snadná obsluha. Hemokultivační lahvičky obsahují kvalitní půdy, které zachytí i špatně kultivovatelné mikroby a zachytí již velmi malou kvantitu. Další nespornou výhodou je, že se snižují nároky na přesnost lidské práce. Práce s lahvičkami je jednoduchá. Výsledky jsou dostupné během několika hodin.

Nevýhodou je velká pořizovací cena přístroje a nákup hemokultivačních lahviček. Tento fakt vyváží rychlá a přesná diagnostika, která má pro lékaře a pacienta velký přínos.

Tato metoda je použitelná v klinické praxi. Kombinací metody kultivace cévního katétru a krevní hemokultury dosáhneme velmi přesné diagnostiky katéetrové sepse.



## Seznam použité literatury

- [1] Anjali Shah, James Mond, and Scott Walsh. Lysostaphin-Coated Catheters Eradicate *Staphylococcus aureus* Challenge and Block Surface Colonization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July 2004, p. 2704-2707, Vol. 48, No. 7
- [2] Ashkenazi S, - Weiss E, - Drucker MM, - Bodey GP. - Bacterial adherence to intravenous catheters and needles and its influence by cannula type and bacterial surface hydrophobicity. *J Lab Clin Med* 1986;107:136--40.
- [3] BD diagnostics systéme [online]. Vystaveno 2006. [cit.2006-12-29]. Dostupné z : <http://www.bd.com/ds/productCenter/BC.asp>
- [4] Bednář Marek, Fraňková Věra, Schindler Jiří, Souček Andrej, Vávra Jiří. *Lékařská mikrobiologie*. Dotisk prvního vydání. Praha 2. Marvil 1996. 558 s.
- [5] Beneš J., Gabrielová A., Horová B.: Naše zkušenosti s hemokultivačním systémem Bactec. *Klin. Mikrobiol. Inf. Lék.*, 1995, 1, 15-19.
- [6] Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:452--6.
- [7] Brun-Buissons C., Abrouch 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.
- [8] Cafiso V, Bertusccio T, Santagali M, Kampanile F, Amicosunte G, Pertli MG et al.. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin. Microbiol. Infect*, December 2004, 1081-8, 10(12).
- [9] Carratalà J. The antibiotic-lock technique for therapy of 'highly needed' infected catheters. *Clinical Microbiology & Infection*, Volume 8 Page 282 - May 2002
- [10] Cleri D.J., Cerrado M.L., Seligman S.J.. Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. *Journ Infect Dis* 1980, 141(6), 781-786.
- [11] Čermák Pavel, Švehlová Kateřina: Stanovení detekčních časů gram – pozitivních bakterií v hemokultivačních přístrojích Bacte 9240 a BasT/Alert. Možnosti využití těchto přístrojů pro kvantitativní bakteriologické vyšetření. Diplomová práce, 2004.
- [12] Černý Vladimír. *Sepse v intenzivní péči*. Praha: Maxdorf, 2002. 211 s. ISBN 80-85912-74-0
- [13] Dobbins BM, - P Kite and - MH Wilcox. Diagnosis of central venous catheter related sepsis-a critical look inside. *J. Clin. Pathol.* 1999,52:165-172
- [14] Drábková Jarmila. *Centrální žilní katétry*. Příbram: MSM, spol.s.r.o.,2001. První vydání.
- [15] Farber BF, Kaplan MH, Clogston AG. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis* 1990; 161: 37-40.

- [16] Fricker-Hidalgo H., Chazot F., Lebeau B. et al.: Use of simulated blood cultures to compare a specific fungal medium with a standard mikroorganism medium for yeast detection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1998, 17, , 113-116.
- [17] Geffers Christine et al., Prävention gefäßkatheterassoziierter Infektionen [online]. Vystaveno 2006. [cit.2006-11-24]. Dostupné z : [http://www.charite.de/krankenhaushygiene/dwnld/lehre/4.\\_Sepsis\\_MRE\\_SoSe\\_2006.pdf](http://www.charite.de/krankenhaushygiene/dwnld/lehre/4._Sepsis_MRE_SoSe_2006.pdf)
- [18] Gray ED, Peters G, Verstegen M, Regelmann WE. Effect of extracellular slime substance from *Staphylococcus epidermidis* on the human cellular immune response. *Lancet* 1984;1:365--7.
- [19] Herrmann M, Suchard SJ, Boxer LA, Waldvogel FA, Lew PD. Thrombospondin binds to *Staphylococcus aureus* and promotes staphylococcal adherence to surfaces. *Infect Immun* 1991;59:279--88.
- [20] Herrmann M, - Lai QJ, - Albrecht RM, - Mosher DF, - Proctor RA. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to surface-bound platelets: role of fibrinogen/fibrin and platelet integrins. *J Infect Dis* 1993;167:312--22.
- [21] Hoyert DL, - Arias E, - Smith BL et al. Deaths: final data for 1999. *Natl Vital Stat Rep* 2001;49:1-113
- [22] Kocianova S, Vuong C, Yao Y. Vovich JM, Fischer ER, De Leo FR, Otto M. Key rolenof poly-gamma-DL-glutamic acid in imunne evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Incest*, March 2005, p.688-94, 115 (3)
- [23] Landry S. L., Kaiser D. L., Wenzel R. P.: Hospital stoy and mortality attributed to nosocomial enterococcal bacteremia. *Am J. Infect. Control.*, 6, 1989, 323 – 329.
- [24] Linarés J., Sitges-Serra A., Garan 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.
- [25] Locci R, - Peters G, - Pulverer G. Microbial colonization of prosthetic devices. IV. Scanning electron microscopy of intravenous catheters invaded by yeasts. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* 1981;173:419--24.
- [26] Locci R, - Peters G, - Pulverer G. Microbial colonization of prosthetic devices. I. Microtopographical characteristics of intravenous catheters as detected by scanning electron microscopy. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* 1981;173:285--92.
- [27] Ludwicka A, Uhlenbruck G, Peters G et al. Investigation on extracelular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1984; 258: 256-267.
- [28] Maki DG, Kluger DM, Crnich CJ. The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. *Mayo Clin Proc.* 2006 Sep;81(9), 1159-71
- [29] Mirrett S., Everts R.J., Reller L.B.: Controlled comparsion of original vented aerobic FAN medium with new nonvented BacT/Alert FA medium for culturing blood. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39, 2098-2101.

- [30] Potužník Vladislav. *Klinická mikrobiologie sepse*. 1 vydání. Praha. Avicenum, 1978. 136 s. ISBN 08-040-78
- [31] Propagační materiály Bact/ALERT
- [32] Reklamní materiál firmy Organon Technika
- [33] Rezende Ederlon Dr. Programa sepsse [online]. Vystaveno 2004. [cit.2006-11-24]. Dostupné z: <http://www.sti-hspe.com.br/programasepsse/eficaciaesegurancadaa.htm>
- [34] Rohner P., Pepey B., Auckenthaler R.: Advantage of combining resin with lytic Bactec blood culture media. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, 35, 2634-2638.
- [35] Rohner P., Auckenthaler R.: Review on evaluations of currently available blood – culture systems. *Clin. Microbiol. Infect.*, 1999, 5, 513-529.
- [36] Sadoyama G., Gontijo Filho P.P: Comparison between the jugular and subclavian vein as insertion site for central central venous catheters: microbiological aspects and risk factors for colonization and infection. *Journ Infect Dis* 2003, 7 (2): 142-148.
- [37] Sheretz R.J, Raad I., Belani A., et al. Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical mikrobiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1990, 28: 76-82.
- [38] Sheth NK, - Franson TR, - Rose HD, - Buckmire FL, - Cooper JA, - Sohnle PG. Colonization of bacteria on polyvinyl chloride and Teflon intravascular catheters in hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 1983;18:1061--3.
- [39] Schauwers Arno. Irregular biofilms are predictable. [online]. Vystaveno 2006. [cit.2007-1-20].Dostupné z: <http://www.delftoutlook.tudelft.nl/info/indexe0ee.html?hoofdstuk=Article&ArtID%3>
- [40] Scharfen J.: Zkušenosti s automatizovaným vyšetřováním hemokultur v systému BacT/Alert. *Klin. Mikrobiol.*, 1995, 2, 7-13.
- [41] Spaargaren J, van Boven C.P.A, Voorn G.P: Effectiveness of resins in neutralizing antibiotic activities in Bactec Plus aerobic/F culture medium. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, 36, 3731-3733.
- [42] Svoboda Petr. *Sepsis v traumatologii a chirurgii*. 1.vydání. Praha: Triton, 2004. 199.s. ISBN 80-7254-550-7
- [43] Tighe M.J., Kite P. Fawley W.N., Thomas D., McMahon M.J.: An endoluminar brush to detect the infected central venous catheter in situ: A pilot study. *BMJ* 1996, 313 (7071): 1528-1529
- [44] Vadyvaloo V, Otto M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical device. *Int J Artur Organs* 2005, 28 (11): 1069-1078.
- [45] Vincent Jean-Louis. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet*, Vol.361, 2003, č. 9374, s. 2068-77
- [46] Vincent JL, - Sakr Y, - Sprung CL - et al. Sepsis in European Intensive care Units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006;34:344-353.

- [47] Von Eiff C, Prostor RA, Peters G. Coagulase-negative-staphylococci. Pathogens have major role in nosocomial infections. Postgrad Med. October 2001, p.63-4, 69-70, 73-6, 110(4)
- [48] Waite R.T., Woods G.L.: Evaluation of Bactec Myco/F Lytic medium for recovery of mycobacteria and fungi from blood. J. Clin. Mikrob., 1998, 36, 1176-1179.
- [49] Zima Tomáš. Laboratorní diagnostika. 1. vydání. Praha: Galén, 2002. 728 s. ISBN 80-7262-201-3. Kapitola 24: Laboratorní diagnostika intenzivní medicíny, s.425-481.

## **Seznam příloh**

Příloha I      Seznam výsledků kultivace katétrů a krevních kultur