

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

**Citlivost multirezistentních kmenů
k dezinfekčním prostředkům**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Pavla Paterová

Hradec Králové, 2014

Bc. Kateřina Chudějová

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové dne

Kateřina Chudějová

PODĚKOVÁNÍ

„Děkuji své školitelce MUDr. Pavle Paterové za odborné vedení při vypracovávání bakalářské práce a za cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za morální a finanční podporu při studiu. Poděkování patří také společnosti MAKRO Cash and Carry v Hradci Králové.“

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra lékařských a biologických věd

Autor: Bc. Kateřina Chudějová

Školitel: MUDr. Pavla Paterová

Název DP: Citlivost multirezistentních kmenů k dezinfekčním prostředkům

Studijní obor: Zdravotnická bioanalýtika – Odborný pracovník v laboratorních metodách

Multirezistentní kmeny (bakterie rezistentní vůči více antibiotikům) se postupně stávají čím dál větším problémem v léčbě infekčních onemocnění v celosvětovém měřítku. Snadno se mohou stát komplikací, která se může vyskytnout během zdravotnické péče a následné léčby. Cílem je jejich množství snížit, omezit jejich množení a přenos mezi pacienty. Jedním z používaných prostředků jsou dezinfekční látky.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit citlivost vybraných multirezistentních kmenů k určitým dezinfekčním prostředkům, které se používají rutinně ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Byly vybrány preparáty používané na Ústavu klinické mikrobiologie (ÚKM): *Manusept[®] Basic* - ethanolová dezinfekce používána v praxi k hygienické a chirurgické dezinfekci rukou, *Sterillium[®] Med* - ethanolová dezinfekce s přídavkem glycerolu, která se používá pro hygienickou a chirurgickou dezinfekci rukou, *Cleanisept[®]* - kombinovaný dezinfekční prostředek k dezinfekci a mytí diagnostických pomůcek a povrchů, *Descosept AF* - ethanolový přípravek k dezinfekci malých ploch, povrchů a diagnostických pomůcek; a dále dezinfekce používané na IV. interní hematologické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové (*Softasept[®] N* - ethanolový přípravek používaný k dezinfekci kůže před odběrem krve, injekcí, punkcemi, *Septoderm* - ethanolová dezinfekce používaná k hygienické a chirurgické dezinfekci rukou, dále k dezinfekci kůže před vpichem či operací).

Metodika stanovení účinku vybraných dezinfekčních látek vychází z Evropské normy **EN 1040**. Jedná se o kvantitativní suspenzní zkoušku ke stanovení baktericidního účinku chemických dezinfekčních látek. Metoda byla modifikována výběrem multirezistentních kmenů gramnegativních tyčinek. K testování byl použit referenční kmen *Pseudomonas aeruginosa* CCM 7930, dále multirezistentní (multi-drug resistant) kmen *Pseudomonas aeruginosa* izolovaný ze stěru z prostředí ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Další multirezistentní kmeny byly klinické izoláty

od pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Hradec Králové: *Klebsiella pneumoniae* ESBL+, *Acinetobacter baumannii* a *Burkholderia cepacia* genomovar *multivorans*.

Po získání všech výsledků jsme zjistily, že dezinfekce používané v laboratořích ÚKM (*Manusept*[®] *Basic*, *Sterillium*[®] *Med*, *Cleanisept*[®] a *Descosept AF*) jsou dostatečně účinné proti všem testovaným multirezistentním kmenům i referenčnímu kmenu *Pseudomonas aeruginosa*. Dezinfekce získané z hematologické kliniky (*Softasept*[®] *N* a *Septoderm*) vykazovaly 100 % účinnost pouze v neředěné formě, a to k referenčnímu kmenu *Pseudomonas aeruginosa* a k multirezistentním kmenům *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* a *B. cepacia*. Ke kmenu *A. baumannii* MR nebyla dle kritérií EN 1040 dezinfekce účinná.

Klíčová slova: multirezistence – dezinfekce – EN 1040 – *Acinetobacter baumannii* – *Klebsiella pneumoniae* – *Pseudomonas aeruginosa* – *Burkholderia cepacia*

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Bc. Kateřina Chudějová

Supervisor: MUDr. Pavla Paterová

Title of diploma thesis: Sensitivity of multiresistant strains to disinfectants

Branch of study: Healthcare bioanalytics – Specialist in Laboratory Methods

Out of multiresistant strains (bacteria resistant to multiple antibiotics), are gradually becoming a bigger problem in all treatments of infectious diseases on a global scale. They can easily become a major complication, which could occur during medical care and following treatments. The requirement is to reduce their quantity, limit their reproduction and transmission between patients. One of the used resources are disinfectants.

The aim of this dissertation is to determine the sensitivity of selected multi-resistant strains against certain disinfectants, which are routinely used at Faculty Hospital in Hradec Králové. The following products used in the Department of Clinical Microbiology have been selected for testing: *Basic Manusept*[®] - ethanol disinfection used in practice for hygienic and surgical hand disinfection, *Sterillium Med*[®] - ethanol disinfection with the addition of glycerol, which is used for hygienic and surgical hand disinfection, *Cleanisept*[®] - combined disinfectant for disinfecting and washing diagnostic tools and surfaces, and *Descosept AF* - ethanol disinfection for disinfection of small surfaces, diagnostic tools and disinfection tools; also tested, were two disinfectant products from our IV. Hematology Clinic of the Faculty Hospital in Hradec Králové. *Softasept N*[®] - ethanol product used to disinfect the skin before blood collection, injections, punctures. As well as *Septoderm* - ethanol disinfection used as a hygienic and surgical hand disinfection, as well as a skin disinfection before injection operations.

The methods used to determine the effect of the selected disinfectants is based on the European standard **EN 1040**. It's about quantitative suspension test for the determination of bactericidal activity of chemical disinfectants. The method was modified by selecting multiresistant strains of gram-negative rods. To further test the reference strain of *Pseudomonas aeruginosa* CCM 7930, multi-drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from swabs of the environment at the University Hospital in Hradec Králové. Other multidrug-resistant strains were clinical isolates from

patients hospitalized in the University Hospital Hradec Králové: *Klebsiella pneumoniae* ESBL +, *Acinetobacter baumannii* and *Burkholderia cepacia* genomovar *multivorans*.

After gathering all the results, we have concluded that the disinfectants used in laboratories of ÚKM (*Manusept*[®] *Basic*, *Sterillium*[®] *Med*, *Cleanisept*[®] and *Descosept AF*) are sufficiently effective against all tested multidrug-resistant strains and also the reference strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Disinfectants obtained from hematology clinics (*Softasept*[®] *N* and *Septoderm*) have shown a 100 % efficiency only in undiluted form against the reference strains of *Pseudomonas aeruginosa* and multi-resistant strains of *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, and *B. cepacia*. The strain of *A. baumannii* MR has not been effective according to the criteria of EN 1040.

Key word: multidrug resistance – disinfectant – EN 1040 – *Acinetobacter baumannii* – *Klebsiella pneumoniae* – *Pseudomonas aeruginosa* – *Burkholderia cepacia*

Obsah

1	Zadání diplomové práce - Cíl práce	12
2	Úvod.....	12
3	Rezistence na antibiotika	13
3.1	Primární rezistence	13
3.2	Sekundární rezistence (získaná)	14
3.2.1	Chromozomální získaná rezistence	14
3.2.2	Antibiotiky stimulovaná mutageneze	14
3.2.3	Rezistence vzniklá extrachromozomálně	15
3.3	Pseudorezistence.....	15
4	Mechanismy vzniku rezistence	15
4.1	Změna cílové struktury	16
4.2	Inaktivace ATB pomocí enzymů	16
4.3	Zhoršením průniku ATB do buňky nebo jeho vypuzení.....	16
5	Nozokomiální nákazy.....	17
5.1	Rozdělení nozokomiálních nákaz	17
5.2	Prevence nozokomiálních nákaz	19
5.2.1	Mytí a dezinfekce rukou	19
5.2.2	Správná indikace ATB léčby	22
6	Multirezistentní kmeny	23
6.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
6.1.1	Kultivace	24
6.1.2	Biochemie a antigenní struktura	25
6.1.3	Faktory virulence.....	25
6.1.4	Patogeneze.....	26
6.1.5	Terapie a rezistence <i>P. aeruginosa</i>	26
6.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
6.2.1	Kultivace	28
6.2.2	Biochemie	29

6.2.3	Faktory virulence.....	29
6.2.4	Patogeneze.....	29
6.2.5	Produkce širokospektrých β -laktamas.....	30
6.2.6	Terapie.....	30
6.3	Acinetobacter baumannii.....	31
6.3.1	Kultivace a biochemie	31
6.3.2	Patogeneze.....	32
6.3.3	Rezistence	32
6.3.4	Terapie.....	33
6.4	Burkholderia cepacia.....	34
6.4.1	Kultivace a biochemie	34
6.4.2	Patogeneze.....	35
6.4.3	Rezistence	35
6.4.4	Léčba.....	35
7	Dezinfekce a sterilizace	35
7.1	Definice.....	35
7.2	Fyzikální dezinfekce.....	36
7.3	Chemická dezinfekce	37
7.3.1	Spektrum účinnosti dezinfekce.....	37
7.4	Přehled skupin dezinfekčních látek	38
7.4.1	Oxidační činidla.....	38
7.4.2	Halogeny.....	38
7.4.3	Alkoholy	38
7.4.4	Povrchově aktivní látky	39
7.4.5	Kombinované přípravky.....	39
7.4.6	Ostatní přípravky.....	39
7.4.7	Kontrola účinnosti dezinfekce.....	40
8	Popis metody.....	43
9	Použitý materiál.....	43

9.1	Testované organismy	43
9.1.1	Citlivost testovaných kmenů k ATB	44
9.2	Testované dezinfekce	45
9.3	Kultivační media a reagentie	48
9.4	Ostatní pomůcky	48
10	Popis pracovního postupu	49
10.1	Suspenze testovaných organismů a validace	49
10.2	Postup pro stanovení baktericidní aktivity přípravku	50
10.2.1	Experimentální podmínky	50
10.2.2	Výběr zkušební metody	51
10.2.3	Výběr neutralizátoru	51
10.2.4	Všeobecné pokyny k validaci a kontrole postupů.....	51
10.2.5	Dilučně-neutralizační metoda	52
10.3	Výpočty.....	53
11	Výsledky	55
11.1	Výpočet CFU v základní suspenzi	55
11.2	Výsledky validace	55
11.3	Výsledky experimentu.....	57
12	Diskuze.....	63
13	Závěr	68
14	Citovaná literatura.....	69
15	Abecední seznam použitých zkratk.....	73
16	Seznam použitých tabulek	76
17	Seznam použitých obrázků.....	77
18	Přílohy	78
18.1	Příloha 1	78
18.2	Příloha 2.....	79

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 Zadání diplomové práce - Cíl práce

Cílem této diplomové práce je určení citlivosti vybraných gramnegativních multirezistentních kmenů k dezinfekcím, které se používají pro povrchovou dezinfekci ploch a kůže ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové (*Ústav klinické mikrobiologie a IV. interní hematologická klinika*).

2 Úvod

Multirezistentní kmeny (bakterie rezistentní vůči více ATB) se postupně stávají čím dál větším problémem v léčbě infekčních onemocnění v celosvětovém měřítku. První rezistentní kmeny byly objeveny v 50. letech 20. století, šlo o kmen *Staphylococcus aureus* rezistentní k meticilinu (dnes označovaný jako MRSA). Postupně se začaly vyskytovat další a další rezistence nejen v rámci tohoto kmene, ale i u ostatních grampozitivních bakterií.

V posledních desetiletích se stává problémem multirezistence gramnegativních bakterií, jde především o zástupce druhů *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a příslušníky čeledi *Enterobacteriaceae*.

Zvýšený výskyt těchto kmenů představuje nežádoucí komplikaci zdravotnické péče prováděné v nemocnicích tj. vznik nozokomiálních onemocnění (zejména na jednotkách intenzivní péče), nárůst morbidity a mortality, ztížená možnost léčby, prodloužení doby hospitalizace, což souvisí se zvýšením přímých i nepřímých nákladů na léčbu (Sas, 2010).

3 Rezistence na antibiotika

Rezistence je schopnost mikroorganismu odolávat působení látek s antimikrobiálním účinkem. Krátce po objevení prvních antibiotik, si mikroby začaly nacházet cestu, jak odolat jejich účinku. Příkladem za všechny může být druh *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), v roce 1946 byla většina jeho kmenů citlivá k penicilinu. V současné době je asi 90 % nemocničních kmenů *S. aureus* k penicilinu rezistentních, protože získaly plazmid kódující schopnost tvořit penicilinasu, tedy β -laktamasu specificky štěpící molekulu penicilinů (Votava, 2006), (Cabrera, a další, 2007).

V posledních letech se objevuje stále více mechanismů, které bakterie používají k ochraně před účinkem ATB (biochemické, molekulárně-genetické, celulární, apod.). Nejvýznamnějším faktorem, který se podílí na rozvoji rezistencí, je špatná indikace ATB, zejména neověření bakteriální infekce (Cabrera, a další, 2007).

Existují dva základní typy rezistence – a to *primární* a *sekundární*.

3.1 Primární rezistence

Odolnost bakterie k danému ATB je podmíněná geneticky, a to bez ohledu na to, jestli došlo k předchozímu kontaktu bakterie s antibiotikem či nikoliv. Příčinou může být např. nízká citlivost cílové struktury (buněčné stěny, ribozomů) k danému ATB nebo absence této struktury. Tato schopnost je dána druhem mikroorganismu a jeho vlastnostmi. Např. gramnegativní střevní tyčinky jsou přirozeně rezistentní k penicilinu, makrolidům a linkosamidům; *Klebsiella* je rezistentní vůči ampicilinu a *Pseudomonas aeruginosa* na kotrimoxazol (Simon, a další, 1998), (Julák, 2006).

Toho, že některé mikroorganismy jsou přirozeně rezistentní na některé typy ATB, lze využít k přípravě selektivních kultivačních pūd. Na těchto pūdách vyrostou požadovaný druh, ale neporostou bakterie, které jsou k danému ATB citlivé. Příkladem může být přidání bacitracinu do kultivačního média pro izolaci hemofilů nebo vankomycinu a kolistinu do pūd určených k záchytu patogenních neisserií (Votava, 2005).

3.2 Sekundární rezistence (získaná)

Většinou vzniká následkem předchozí antibiotické léčby. Při působení ATB na bakterie se selektují ty bakteriální varianty, které jsou proti němu odolné, tyto znaky potom předávají potomstvu.

Kmeny rezistentní na ATB v přítomnosti daného ATB přežívají a díky působení ATB na vnímavou populaci se brzy přemnoží. K tomu často dochází v nemocničních zařízeních, kde se pak rezistentní kmeny mohou šířit mezi pacienty i personálem (Julák, 2006).

3.2.1 Chromozomální získaná rezistence

U tohoto typu rezistence dochází k mutacím (bodovým i rozsáhlejším) na chromozomech, tyto informace se poté předávají z mateřských na dceřiné buňky replikací. Mutace vedou ke změnám ve struktuře nově syntetizovaných bílkovin, takže mohou vznikat produkty, které mají sníženou schopnost vázat ATB. Tento typ rezistence nemusí souviset s předchozím působením ATB na bakterii, pokud ovšem bude na tuto bakterii dané ATB působit, vytváří se tzv. *selekční tlak*, tím se zvyšuje frekvence vzniku rezistencí. Vzniká jako následek nadměrného a nevhodného používání ATB k léčbě nemocí, které tento zásah nevyžadují (Bednář, a další, 1996).

3.2.2 Antibiotiky stimulovaná mutageneze

Pokud je bakteriální buňka vystavována různým stresům, dochází v ní ke zvýšené frekvenci vzniku mutací. ATB jsou jistou formou těchto stresů, které působí na buňku, a tudíž podněcují další vznik mutací, které mohou vést ke vzniku rezistence. ATB, která navyšují počet mutací, jsou převážně ta, která poškozují DNA bakteriální buňky, např. chinolony, nitroimidazoly, apod.

Podobný účinek mají i ATB, která ovlivňují proteosyntézu. Pravděpodobným vysvětlením častějšího vzniku mutací je tvorba špatně fungujících DNA-polymeras, ev. dalších důležitých enzymů. Jedná se o děj reverzibilní, protože časem dojde k obnovení funkce ribozomů a syntéze plně funkčních enzymů (Heinemann, 1999).

3.2.3 Rezistence vzniklá extrachromozomálně

Plazmidy

Jedná se o malé kruhové molekuly DNA schopné samostatné replikace v bakteriální buňce. Nesou poměrně málo genů, které nejsou pro bakterii nezbytně důležité. Existuje více typů plazmidů, ale pro rezistenci jsou nejdůležitější plazmidy F a R. *Plazmid F* (fertilní) odpovídá za tvorbu sex-pilů mezi dvěma buňkami – donorovou a recipientní - a přenos plazmidů. *R plazmid* je molekula bakteriální rezistence, která se při množení může přenášet v rámci jednoho druhu, ale i mezi druhy jednotlivými (Simon, a další, 1998), (Votava, 2005). (Bennet, 2008) uvádí také možnost experimentálního přenosu plasmidů z gramnegativní do grampozitivní bakterie.

Fragmenty plasmidové DNA mohou být také přeneseny mechanismem transdukce nebo transformace (Bednář, a další, 1996).

Transpozony

Transpozony se často označují jako skákající geny. Jsou to krátké úseky DNA, které se mohou pohybovat v rámci jedné molekuly DNA nebo mohou přeskokovat z této molekuly na jinou, např. z jednoho plasmidu na jiný, nebo z plasmidu na bakteriální chromozom a naopak (Julák, 2006), (Bennet, 2008).

3.3 Pseudorezistence

Tento fenomén je typický tím, že daný kmen *in vitro* vykazuje značnou rezistenci k antimikrobiální látce, ale *in vivo* je k ní citlivý (Sussmann P., a další).

4 Mechanismy vzniku rezistence

Se vznikem rezistence úzce souvisí mechanismus účinku antimikrobiálních látek. Antibiotika lze rozdělit do několika skupin podle jejich cílových struktur na bakteriální buňce (inhibice syntézy buněčné stěny, inhibice vzniku nukleových kyselin, poškození buněčné membrány, inhibice proteosyntézy, atd.). Jednotlivé mikroorganismy mají své mechanismy, které jim umožňují odolávat působení antimikrobiálních látek. Obecně je známo několik základních mechanismů.

4.1 Změna cílové struktury

Tento mechanismus je založen na změně cílového místa působení daného ATB. Klíčovou vlastností cílových míst je jejich nepostradatelná role pro život bakteriální buňky. Když se ATB na takové místo naváže, způsobí u bakterie buď inhibici růstu, nebo smrt buňky.

Příkladem jsou např. mutace v genech kódujících ribosomální RNA (rRNA) – ATB inhibující proteosyntézu (např. tetracykliny nebo makrolidy) se neváží na změněnou rRNA v dostatečné míře nebo dostatečnou dobu. Dalším příkladem je drobná změna *penicillin binding proteins* (PBP, penicilin vázající proteiny), která může způsobit neúčinnost β -laktamových ATB. Tento mechanismus je fenotypově vyjádřen u meticilin-rezistentního kmene *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Sussmann P., a další).

V nedávné době byl popsán zajímavý fenomén rezistence k chinolonům. Ta může být způsobena mutací v cílových místech DNA-gyrasy (resp. topoisomerasy), ale také syntézou krátkého peptidu, který DNA-gyrasu chrání před vazbou antibiotika. Jedná se o proteiny nazvané *Qnr* (Daza Pérez, 1998).

4.2 Inaktivace ATB pomocí enzymů

Typickým příkladem jsou **β -laktamasy** (peniciliny), které produkuje asi 50 - 80 % kmenů stafylokoků. U grampozitivních bakterií jde o exoenzymy, které jsou vylučovány bakteriemi do okolí (volné β -laktamasy). Naopak u gramnegativních aerobních i anaerobních bakterií jsou β -laktamasy obvykle vázány v periplazmatickém prostoru. Substrátem β -laktamasy je β -laktamový kruh, který otevírají a tím inaktivují celé ATB (např. penicilin je přeměněn na neúčinný penicilinát)

Na podobném principu funguje rozklad chloramfenikolu na neúčinný derivát, způsobený enzymem acetyltransferasou, která je kódovaná na plasmidu. Stejným enzymem mohou být rozloženy i aminoglykosidy, ve spolupráci s jinými enzymy, jejichž geny jsou mezirodově přenášeny na plasmidech, transpozonech a integronech (Sussmann P., a další), (Julák, 2006).

4.3 Zhoršením průniku ATB do buňky nebo jeho vypuzení

Častým mechanismem je adaptace buňky na přítomnost ATB. První bariérou vstupu je buněčná stěna, proto snížením její propustnosti nemůže ATB pronikat ke svým cílovým místům. Vstup většiny antibiotik do buňky gramnegativních bakterií

zajišťují pasivní přenašeče – *poriny*. Jejich strukturní změnou, případně jejich sníženou expresí nepronikne ATB do buňky a ta pak získá určitý stupeň rezistence.

Zároveň může docházet k aktivnímu vypuzení antibiotika z buňky systémem tzv. *effluxních pump*. Ty jsou schopny selektivně vychytávat pro buňku toxické látky (tedy i ATB) z cytoplazmy, případně z periplazmatického prostoru. Tím dochází ke snížení koncentrace ATB v buňce a jejich nedostatečné účinnosti (Daza Pérez, 1998).

5 Nozokomiální nákazy

Nozokomiální nákaza (NN) je nákaza, která vznikla v přímé souvislosti s pobytem osob ve zdravotnickém zařízení (ústavní i ambulantní části). Za nemocniční nákazu se považuje i nákaza, která se projeví po propuštění do domácí péče. Za NN se nepovažuje onemocnění, se kterým je pacient do nemocnice přijat (Maďar, a další, 2006).

Nozokomiální infekce nejčastěji vznikají na odděleních intenzivní péče. Různé prameny uvádějí, že četnost výskytu NN je zde asi 10 – 50 %, což je 5 – 10x častěji než na tzv. standardních odděleních (Sas, 2010).

Při výskytu nemocniční nákazy nebo při podezření na její výskyt je ošetřující lékař povinen neprodleně provést protiepidemická opatření a příslušná vyšetření, nutná k odhalení zdroje nákazy, způsobu jejího šíření a zamezení dalšího šíření. Dále je povinen okamžitě zahájit léčbu jak zasažených, tak z nákazy podezřelých pacientů (Míčková, 2009).

5.1 Rozdělení nozokomiálních nákaz

Nákazy, které zpravidla odrážejí epidemiologickou situaci ve spádové oblasti zdravotnického zařízení (např. běžné respirační nemoci, které se vyskytují i v jiných kolektivech, například ve školách, školkách, na pracovištích...), se nazývají **nespecifické NN**.

Jako **specifické NN** jsou označovány ty infekce, které vznikají jako důsledek diagnostických a terapeutických lékařských výkonů u hospitalizovaného pacienta, jejich výskyt ovlivňuje úroveň asepse, sterilizace a dezinfekce, úroveň zásad protiepidemického režimu.

Pokud bylo infekční agens do organismu zaneseno zvenčí např. důsledkem nedostatečné dezinfekce/sterilizace, jsou takové infekce řazeny mezi **exogenní**.

Mezi **endogenní** patří takové infekce, které byly způsobeny mikroorganismy běžně se vyskytujícími v těle. Jde většinou o kmeny nepatogenní nebo tzv. oportunní, (příležitostné) patogeny. Uplatňují se zejména při imunodeficienci, kdy je fyziologicky vyskytující se mikrobiální flóra (např. v gastrointestinálním traktu) schopna proniknout do jiného systému, kde se běžně nevyskytuje, např. do urogenitálního systému, krevního oběhu, břišní dutiny a dalších míst. K přenosu infekce může dojít i při operacích nebo instrumentálních zákrocích (Šrámová, 1995).

Pro bakteriální etiologii má velký význam i doba vzniku nozokomiální infekce, respektive doba od přijetí pacienta na oddělení. **Nozokomiální infekce** mohou být **časné**, které vznikají mezi 2. – 5. dnem hospitalizace, nebo **pozdní**, vznikající od 5. dne přijetí pacienta do nemocniční péče. U časných infekcí se uplatňují spíše bakterie patřící k primární mikroflóře, které byly zavlečeny do rány během operace, ty jsou většinou citlivější k ATB. Zatímco u pozdních infekcí sekundárně kolonizující bakterie s vyšší mírou rezistence. Rovněž tato skutečnost musí být vzata v úvahu při volbě antibiotické léčby (Saene, a další, 2012). **Tab. 1** ukazuje zastoupení nejčastějších infekcí u NN. **Tab. 2** poté ukazuje nejčastější původce NN jak časných, které jsou způsobené většinou komunitními patogeny, tak pozdních, ty naopak způsobují patogeny nemocniční.

Tabulka 1 Nejčastější infekce u nozokomiálních nákaz a jejich procentuální zastoupení

klinické projevy NN	procentuální zastoupení
<i>močové infekce</i>	<i>cca 40 %</i>
<i>infekce chirurgických ran</i>	<i>cca 25 %</i>
<i>nozokomiální pneumonie</i>	<i>cca 20 %</i>
<i>nozokomiální bakteremie</i>	<i>cca 10 %</i>
<i>ostatní</i> <ul style="list-style-type: none"> - <i>infekce kůže a měkkých tkání</i> - <i>gastroenteritida</i> - <i>sinusitida, inf. oka a spojivky</i> - <i>endometritida</i> 	

Převzato z: prezentace pro LFHK – [Nozokomiální nákazy](#) – Dr. I. Janovcová CSc. [22. 4. 2014]

Tabulka 2 **Přehled potenciálně patogenních mikroorganismů (PPM)**

Komunitní PPM	Nemocniční PPM
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Klebsiella spp.</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Proteus spp.</i>
<i>Moraxella catharalis</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter spp.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Citrobacter spp.</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Serratia spp.</i>
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>

Převzato z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgraduální-medicína/nozokomialní-infekce-a-infekce-multirezistentními-organismy-v-podmínkách-intenzivní-péče-455567> [11. 02. 2014]

5.2 Prevence nozokomiálních nákaz

Jedním z nejdůležitějších preventivních opatření je správné preventivní chování nemocničního personálu, dodržování zásad bariérového ošetřování a dezinfekce rukou. Dále je také důležité udržování čistoty v nemocničním prostředí, správná manipulace s čistým a použitým prádlem, s použitými nástroji, pomůckami a biologickým materiálem (Sas, 2010).

Ke snížení přenosu NN je prováděna správná dezinfekce kůže a povrchů pomocí dezinfekcí a dekontaminačních prostředků, které se musí periodicky obměňovat. Mezi preventivní opatření patří také používání jednorázových pomůcek, správné provádění sterilizace a vyšší úrovně dezinfekce nástrojů a přístrojů. V neposlední řadě je nutná ochrana vody, vzduchu a potravin ve zdravotnickém zařízení. Při případném výskytu infekce, je nutné zamezit jejímu šíření izolací zdroje nákazy (Míčková, 2009).

5.2.1 **Mytí a dezinfekce rukou**

Hygiena rukou je základním opatřením v prevenci infekcí. Jde možná o velmi prostou činnost, ale nedostatky v jejím dodržování u poskytovatelů zdravotní péče jsou celosvětovým problémem. Na základě výzkumu dodržování hygieny rukou a strategií podporujících její prosazování byla prokázána účinnost některých nových přístupů. Byla navržena řada strategií na prosazování a zlepšování hygieny rukou a Světová zdravotnická organizace (WHO, SZO) v rámci globální výzvy ke zvýšení bezpečnosti pacientů zaměřuje část své pozornosti na zlepšení standardu praxe hygieny rukou při poskytování zdravotní péče a současně na zavádění nových postupů (WHO, 2011).

Obecně lze postupy v hygieně rukou rozdělit na **mytí a dezinfekci rukou**. Mytí rukou zahrnuje běžné mytí a předoperační mytí rukou, dezinfekce pak hygienickou a chirurgickou dezinfekci rukou.

Účelem **mytí rukou** je odstranění nečistot z rukou a provádí se pod tekoucí vodou za použití tekutých mýdel po dobu 40 – 60 sekund. Po závěrečném oplachu pitnou vodou se ruce osuší jednorázovým papírovým ručníkem (obr. 1). **Předoperační mytí rukou** je zaměřeno na odstranění nečistot, částečně i přechodné kožní flóry z rukou. Provádí se mytím rukou včetně předloktí před chirurgickou dezinfekcí rukou při použití alkoholových dezinfekčních přípravků. Ruce se opět opláchnou pitnou vodou a osuší jednorázovým papírovým ručníkem (Hedlová, 2010).

Obrázek 1 Postup při mytí rukou



Převzato z: SZÚ – [Souhru Směrnice WHO – Hygiena rukou ve zdravotnictví](#)

Hygienická dezinfekce rukou je namířena proti ulpívající přechodné kožní mikroflóře. Provádí se tak, že se dostatečné množství alkoholového přípravku vtírá do suchých rukou po určitou dobu (min. 30 s). Ruce se poté vodou už neoplachují. Po opakované dezinfekci se ruce ošetří regeneračním krémem (obr. 2). **Chirurgická dezinfekce rukou** je namířená proti přechodné kožní mikroflóře i proti kožní mikroflóře ve vnitřních vrstvách pokožky rukou. Při použití alkoholových dezinfekčních přípravků se po dokonalém usušení rukou (po chirurgickém mytí) vtírá dezinfekce opakovaně do pokožky rukou a předloktí po stanovenou dobu (většinou 3 min). Po celou dobu působení by měly být ruce vlhké; množství přípravku závisí na velikosti dezinfikované plochy (doporučeno 2 – 3x 1,5 ml) (Hedlová, 2010).

Obrázek 2 Postup pro dezinfekci rukou

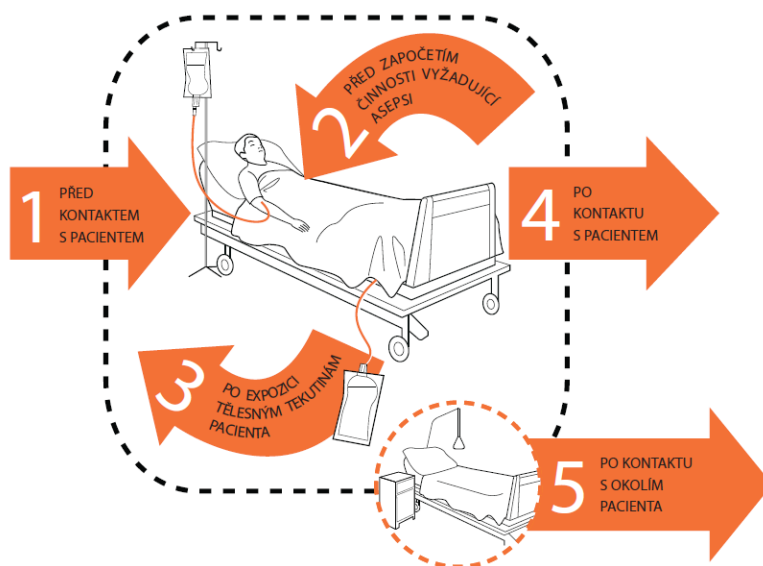


Převzato z: SZÚ – [Souhm Směrnice WHO – Hygiena rukou ve zdravotnictví](#)

WHO ve směrnici z roku 2009 definovalo pět základních situací, kdy je nutné dezinfikovat ruce (obr. 3):

- 1) před kontaktem s pacientem
- 2) před započítím činnosti vyžadující asepsi
- 3) po expozici tělesným tekutinám pacienta
- 4) po kontaktu s pacientem
- 5) po kontaktu s okolím pacienta

Obrázek 3 5 základních situací pro hygienu rukou



Převzato z: SZÚ – [Souhm Směrnice WHO – Hygiena rukou ve zdravotnictví](#)

Se správnou hygienou rukou souvisí také nošení sterilních rukavic. Ideál jsou dezinfikované ruce + sterilní rukavice. Nošení prstenů a náramků není přípustné při všech činnostech spojených s přímým poskytováním péče pacientům. Není také povoleno nošení umělých a nalakovaných nehtů. Přirozené nehty musí být upravené, krátké a čisté (Míčková, 2009).

Národní a mezinárodní akreditační systémy kladou na oblast prevence a kontroly infekcí souvisejících se zdravotní péčí velký důraz. Od roku 2006 je mezi mezinárodní bezpečnostní cíle *Joint Commission International* (JCI, společnost udělující mezinárodní akreditace) zařazena hygiena rukou. JCI požaduje, aby zdravotnické zařízení zavedlo program zaměřený na hygienu rukou jako účinný nástroj k minimalizaci rizika vzniku a šíření NN. Tyto programy musí být založeny na poznatcích WHO nebo *Centrum for Disease Control and Prevention* (CDC) (Hedlová, 2010).

5.2.2 Správná indikace ATB léčby

K omezení výskytu multirezistentních kmenů ve zdravotnických zařízeních je velmi důležitá správná indikace ATB léčby a omezení používání ATB se širokým spektrem účinku (Kolář, 2000).

Účinnost ATB je v současnosti vážně ohrožena narůstající a rychle se šířící rezistencí mikrobů. Za zhruba 10 let došlo k vzestupu rezistence některých významných původců infekcí až o desítky procent. Příčinou vzestupu antibiotické rezistence je časté nadužívání a nesprávné používání ATB (zejména širokospektrých) v humánní a veterinární medicíně, ale i nedostatky v oblasti prevence a kontroly infekcí v běžné populaci a ve zdravotnických zařízeních (Zálabská, a další, 2012).

Spotřebu ATB je možné ovlivnit:

- prováděním *správné klinické praxe*, správné indikace ATB, rychlá identifikace původce nákazy, upřednostňování ATB s úzkým spektrem účinnosti, atd.
- prováděním *správné laboratorní praxe*, používáním standardních vyšetřovacích metod pro zjištění citlivosti kmene (MIC, difúzní disková metoda), a ověřováním postupů vnitřními a vnějšími kontrolami kvality
- prováděním lokální *antibiotické politiky*, jejímž základem je aktivní sledování průběžně používaného spektra ATB a jeho ovlivňování s cílem snížit spotřebu ATB a tím jejich selekční tlak při vzniku rezistence (Šrámová, 2001).

6 Multirezistentní kmeny

Multirezistentní kmeny jsou kmeny bakterií, které jsou rezistentní proti třem nebo více druhům antibiotik, které jsou proti patogenu potenciálně účinné. Tyto patogeny se nejčastěji vyskytují v nemocničním prostředí, kde způsobují nozokomiální nákazy. Kmen může být rezistentní k několika příbuzným ATB, ale i k více ATB, které jsou strukturálně zcela odlišné (Schindler, 2009).

Multirezistence často vzniká získáním genů z plazmidů nebo transpozonů, ty se mohou sdružovat do ostrůvků rezistence. Byl popsán systém genových kazet, které umožňují pohyb rezistenčních genů. Kazety obsahují pouze jeden gen kódující rezistenci vůči určitému ATB a celou rodinu receptorových prvků, integronů, které poskytují místo pro integraci kazety. Pohyb genových kazet, tj. jejich vnesení a vytržení z integronů, se odehrává specifickou rekombinací. Integrony se však mohou také přemísťovat, což je velmi důležité pro pohyb rezistenčních genů mezi různými bakteriálními druhy. Umožňuje to totiž integronům a rezistenčním genům připojení na řadu plazmidů se širokým spektrem hostitelů. Kazety se mohou integrovat do receptorových elementů (integronů), nebo se z nich vydělit, anebo se integrovat na jiných místech chromozomu. Tak může vzniknout sestava několika rezistenčních genů (Spížek, 1999).

Jiný mechanismus, díky kterému se bakterie stávají multirezistentní, kóduje gen *mar*. Jde o gen pro *mnohočetnou antibiotickou rezistenci*, který kóduje proteiny tvořící odtokovou pumpu (efflux pump), ta vypuzuje ATB z cytoplazmy a pomáhá udržovat mezibuněčné hladiny ATB pod smrtelnou koncentrací. Pumpa MAR je složená z bílkovin *MarA* a *MarB*, ty jsou blokovány regulační bílkovinou *MarR*. Při její mutaci dochází ke zvýšenému vypuzování ATB z buňky, což způsobí neúčinnost léčiva (Poole, 2000).

6.1 *Pseudomonas aeruginosa*

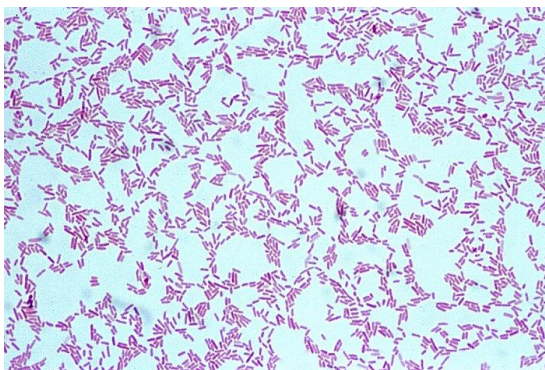
Rod *Pseudomonas* jsou striktně aerobní, nefermentující, nesporující, rovné nebo mírně zahnuté gramnegativní tyčinky, které se pohybují pomocí polárně umístěných bičků (obr. 4). Jsou kultivačně nenáročné a dobře rostou na běžných kultivačních médiích (Julák, 2006).

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) představuje jednoznačně nejčastěji izolovaný a klinicky nejvýznamnější druh celého rodu. Vyskytuje se hojně v různých vodách včetně odpadních, ve střevě obratlovců, na rostlinách a v půdě. Ve velkém

množství může zamořovat nemocniční prostředí, kde kontaminuje katetry, infuzní roztoky, dýchací přístroje atd. Patří k obávaným původcům nozokomiálních nákaz, na kterých se podílí ve více než 10 % případech (Votava, 2006).

6.1.1 Kultivace

Kultivace je velmi snadná. Roste na běžných půdách, na krevním agaru (KA) vykazuje obvykle β -hemolýzu, perleťový až kovový lesk, pigmentaci a zápach (obr. 5). *P. aeruginosa* může tvořit celou řadu pigmentů, které dávají barvu koloniím. Nejčastěji jde o modrozelený *pyocyanin* (methylhydrofenazin), který spontánně oxiduje na α -oxyfenazin, a žlutý *fluorescein*. Mladé kolonie vydávají vůni připomínající jasmínový či lipový květ, starší páchnou po amoniaku (Schindler, 2009). Některé kmeny mohou mít slizový obal připomínající pouzdro. Podle jeho přítomnosti se mohou vyskytovat v **růstových fázích** R (rough, drsná), S (smooth, hladká) a M (mukózní) (Julák, 2006).



Obrázek 4 *Pseudomonas aeruginosa* – mikroskopický preparát barvený dle Grama

Převzato z: <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/photo2detail.php?id=158> [21. 4. 2014]



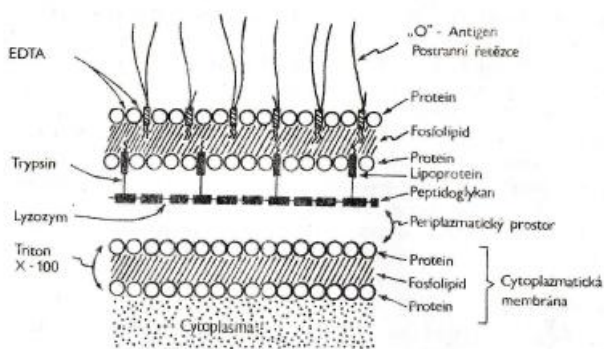
Obrázek 5 *Pseudomonas aeruginosa* na krevním agaru

Převzato z: http://www.bakteriologieatlas.de/Bakterien/Pseudomonas_aeruginosa.htm [10. 3. 2014]

6.1.2 Biochemie a antigenní struktura

Jelikož pseudomonády patří mezi nefermentující bakterie, nejsou schopny fermentovat glukosu. Ale mohou ji štěpit aerobně respiračním mechanismem (využívají tedy v drtivé většině jako akceptor elektronů kyslík). *P. aeruginosa* také vykazuje oxidasovou, katalasovou a ureasovou aktivitu. Biochemické dourčení je významné hlavně u nepigmentovaných kmenů *P. aeruginosa*, které tvoří asi 5 – 20 % všech izolátů tohoto druhu.

Antigenní struktura (obr. 6). Na základě tělových antigenů (O Ag) se zatím rozlišuje 17 serotypů *P. aeruginosa*. Kromě somatických Ag obsahují pseudomonády také antigeny bičíkové a fimbriální (Jedličková, 1981).



Obrázek 6 Schéma povrchu *Pseudomonas aeruginosa*

Převzato z: Jedličková Zdena (1981) *Pseudomonas aeruginosa*, ACADEMIA, Praha, str. 15, ISBN 509-21-827

6.1.3 Faktory virulence

Patogenita je dána strukturami vázanými na bakteriální buňku i tvorbou různých exolátů.

Na bakteriální buňku je vázán zejména **endotoxin** (lipopolysacharid, LPS), který představuje soubor typově specifických antigenů indukujících tvorbu opsonizujících protilátek. Na patogenitě se dále podílí extracelulárně vázaný polysacharid **alginát**, který je hojně vytvářen mukózními kmeny nalézajícími často u pacientů s cystickou fibrózou plic.

Z látek produkovaných vně buňky mají pro patogenitu mikroba význam zejména **proteolytické enzymy** štěpící kolagen, fibrin a elastin a poškozující stěny kapilár. Výsledkem jejich působení je tak vznik hemoragií a nekróz, dále inhibice fagocytózy a zábrana opsonizace kvůli narušení složek komplementu. Dalšími produkty jsou dva typy **hemolysinů** – a to *fosfolipasa C* a termostabilní glykolipid s cytotoxickou aktivitou.

Některé kmeny produkují i **exotoxiny**, které působí podobným mechanismem jako difterický toxin.

Mezi faktory virulence může být počítán i **pyocyanin**, který omezuje pohyb řasinek sliznic dýchacího traktu a inhibuje mitochondriální enzymy (pyocyanin má i antibakteriální účinky) (Koleman, a další, 2008).

6.1.4 Patogeneze

P. aeruginosa vyvolává řadu závažných onemocnění, která mohou postihnout téměř kterýkoliv orgán. Tyto infekce postihují především osoby s porušenou imunitou, těžkým základním onemocněním (hemoblastóza, diabetes mellitus, autoimunitní onemocnění, cystická fibróza a další), pacienty s imunosupresí (např. po transplantacích) a lidi užívající širokospektrá ATB. *P. aeruginosa* často také napadá otevřené rány nebo popáleniny, následné infekce mohou být až v 60 % smrtelné.

Zdraví jedinci, kteří jsou kolonizováni bez projevu onemocnění, se pak stávají přenašeči. Jelikož se tato bakterie může vyskytovat téměř všude, je mnoho možných zdrojů infekce, jak endogenních, tak i exogenních.

Výsledkem infekce způsobené pseudomonádou je podle místa vstupu do těla – často **močové infekce** po zavedení kolonizované cévky; v případě kolonizace cévních katétrů vzniká **bakteriémie** a následná **seps**; může také vznikat **endokarditida**, **meningitida** nebo **pneumonie**. Pseudomonádové pneumonie jsou zvláště nebezpečné u pacientů s cystickou fibrózou, u kterých se uplatňují zejména kmeny s proteasovou aktivitou.

V posledních letech se *P. aeruginosa* stává čím dál častěji původcem **nozokomiálních nákaz** díky své zvyšující se rezistenci k různým ATB. Zdrojem jsou obvykle kontaminované terapeutické a diagnostické pomůcky, zejména katétry, kanyly, endoskopy atd. Bakterie je schopná se také pomnožovat v roztocích některých dezinfekcí (Baltch, a další, 1994).

6.1.5 Terapie a rezistence *P. aeruginosa*

Terapie u pseudomonádových infekcí bývá často obtížná, díky své schopnosti přejímat od jiných mikrobů geny kódující mnohočetnou rezistenci k antimikrobiálním látkám a předávat je dalším kmenům.

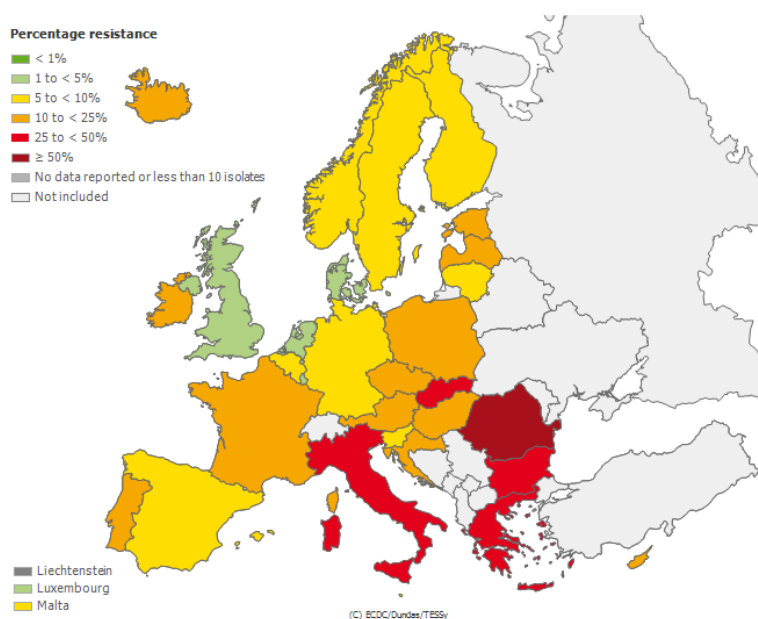
Rezistence na ATB je dána souhrou effluxní pumpy (např. *MexAB-OprM*) vypuzující mnohá léčiva z buňky, chromozomálních genů antibiotické rezistence a malou propustností bakteriální stěny. Kromě této primární rezistence *P. aeruginosa* snadno získává sekundární rezistenci, ať už mutací chromozomálních genů nebo

horizontálním přenosem genů antibiotické rezistence. Další příčinou může být modifikace bakteriálních porinů, které normálně zabezpečují vstup a odvod látek do/z buňky (Gómez Álvarez, a další, 2005).

Některé kmeny *P. aeruginosa* mohou tvořit **β -laktamasy**, které štěpí β -laktamasový kruh ATB, ty pak ztrácí účinnost. U pseudomonád se β -laktamasy vyskytují ve dvou základních formách – *metalo- β -laktamasy* (MBL), což jsou enzymy hydrolyzující peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy. Nejsou inhibovány inhibitory β -laktamas, ale mohou být inhibovány cheláty kovových iontů, jako jsou EDTA, kyselina 2-merkaptopropionová nebo *p*-chloromerkuribenzoát. Dalším typem jsou *širokospektré β -laktamasy*, které jsou kódované na plazmidech, způsobují rezistenci k penicilinům a cefalosporinům, a mohou být inhibovány kyselinou klavulanovou (Hrabák, a další, 2010).

Obr. 7 znázorňuje výskyt *P. aeruginosa* rezistentní k ceftazidimu (cefalosporiny) v rámci Evropy, a pochází z výzkumu ECDC z roku 2012. V ČR je výskyt tohoto rezistentního kmene na 10 – 25 %.

Obrázek 7 Procenta zastoupení rezistentního kmene *P. aeruginosa* k ceftazidimu v rámci Evropy, 2012



Převzato z: EARS-net, ECDC

V současné době se tedy k **léčbě** využívá protipseudomonádových penicilinů (piperacilin), cefalosporinů III. (ceftazidim) a IV. generace (cefepim), karbapenemů (imipenem, meropenem) nebo fluorochinolonů (ciprofloxacin) (Gómez Álvarez, a další, 2005), (del Mar Casal, a další, 2012).

Jako **prevence** by připadalo v úvahu využití polyvalentních vakcín připravených z tělových antigenů, které jsou nyní v klinickém testování (Votava, 2006).

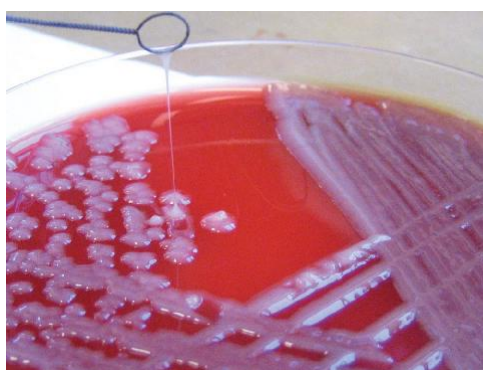
6.2 *Klebsiella pneumoniae*

Rod *Klebsiella* se taxonomicky řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se gramnegativní nesporulující, fakultativně anaerobní, nepohyblivé tyčinky. Klebsiely jsou velmi dobře adaptovány k životu i mimo střevo. V poslední době se stává závažným nozokomiálním patogenem a je nejčastějším producentem širokospektrých β -laktamas (ESBL+).

Nejběžnějším druhem klebsiel je *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (poměrně běžná je i *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*)). Běžně se vyskytuje ve fyziologické flóře úst, kůže a gastrointestinálního traktu, v přírodě se nachází v půdě, kde asi 30 % jejích kmenů je schopno fixovat dusík za anaerobních podmínek (Julák, 2012).

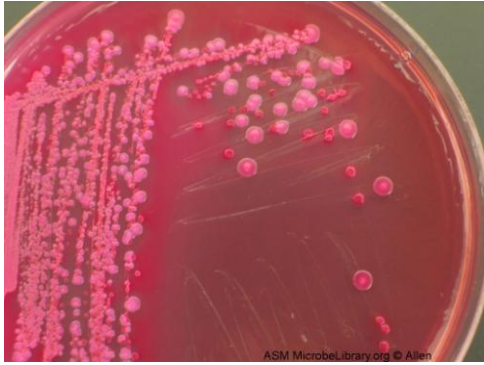
6.2.1 **Kultivace**

K. pneumoniae roste na běžných kultivačních půdách, jelikož je často obalena polysacharidovým pouzdrém, roste na agaru v mukózních koloniích bíle pigmentovaných (obr. 8). Pouzdro se dá znázornit barvením dle Burriho. Na Endově půdě barevně připomínají kolonie jahodovou zmrzlinu – díky laktosové pozitivitě (obr. 9) (Votava, 2006).



Obrázek 8 *Klebsiella pneumoniae* na krevním agaru, bíle pigmentované kolonie, slizovité

Převzato z: <https://www.mja.com.au/journal/2010/193/9/community-acquired-klebsiella-pneumoniae-liver-abscesses-emerging-disease> [12. 3. 2014]



Obrázek 9 *Klebsiella pneumoniae* na Endově půdě

Převzato z: <http://lib.jiangnan.edu.cn/asm/112-Introduce1.htm> [12. 3. 2014]

6.2.2 Biochemie

Klebsiely jsou značně biochemicky aktivní a obtížně se odlišují od rodu *Enterobacter*. Důležitá je ale absence pohybu a ureasová aktivita a laktosová pozitivita. Od *K. oxytoca* se *K. pneumoniae* odliší neschopností štěpit indol.

6.2.3 Faktory virulence

K. pneumoniae má schopnost využívat **železo** z krve hostitele, které potřebuje ke svému růstu. Dále na svém povrchu bakterie nesou dva typy antigenů. Jedním z nich je lipopolysacharidový **O-Ag**, který existuje v 9 variantách. Druhým je kapsulární antigen (**K-Ag**). Oba antigeny jsou významným faktorem u vzniku plicních infekcí. Některé typy totiž na sebe mohou vázat plicní surfaktant, který potom umožní jejich fagocytózu. Pokud se jedná o O-Ag tzv. nereaktivního typu, nemohou vázat surfaktant. Proto se tyto serotypy snadněji stávají původci pneumonie. Také se mohou uplatňovat různé **fimbrie**, které napomáhají při adhezi na povrchy (Julák, 2012).

6.2.4 Patogeneze

K. pneumoniae se může vyskytovat jako střevní komenzál, a také se často vyskytuje v prostředí, které je častým zdrojem infekcí. Jedná se o nejčastějšího původce **močových infekcí**, podobně jako *Escherichia coli*. Oproti jiným enterobakteriím se často uplatňuje při vzniku **sepsí**, hlavně nozokomiálních. Důležité jsou také infekce dýchacích cest – může se jednat o **pneumonie** s rychlým nástupem nebo i o plicní abscesy.

V nemocničním prostředí může také kolonizovat katétrů, nebo diagnostické pomůcky, u pacientů po chirurgických zákrocích infikuje rány nebo popáleniny. Stává se tak častým původcem **nemocničních nákaz** (Votava, 2006).

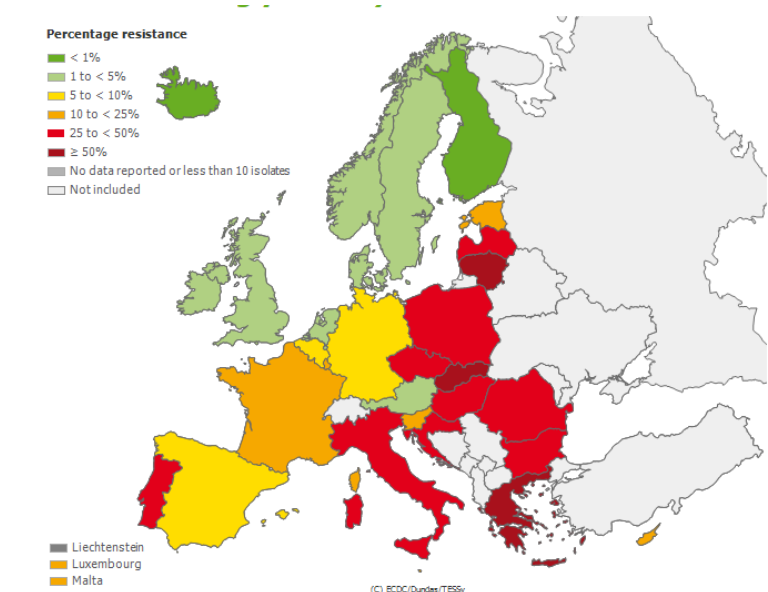
6.2.5 Produkce širokospektrých β -laktamas

Širokospektré β -laktamasy (ESBL+) jsou enzymy, které hydrolyzují β -laktamový kruh, který je součástí penicilinů, cefalosporinů a monobaktamů, tím se ATB stává neúčinným. ESBL jsou kódovány na plazmidech a to zejména geny *TEM-1*, *TEM-2* a *SHV-1* (někdy i *SHV-2*). V současné době je identifikováno přes 400 druhů ESBL. Jsou inhibovány *inhibitory β -laktamas* – a to kyselinou klavulanovou, tazobaktamem a sulbaktamem. Produkují je zejména gramnegativními tyčinky, největšími producenty jsou kmeny *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* (Paterson, a další, 2005).

ESBL byly identifikovány na začátku 80. let, a od té doby se staly sledovaným problémem. Výskyt těchto kmenů *K. pneumoniae* je ve většině zemí asi 20 - 50 %, ve zvýšené míře se vyskytují ve Východní Evropě, Asii a Latinské Americe (Paterson, a další, 2004).

Obr. 10 znázorňuje výskyt multirezistentní *K. pneumoniae* v rámci Evropy, a pochází z výzkumu ECDC z roku 2012. Výskyt tohoto multirezistentního kmene je v ČR 25 – 50 %.

Obrázek 10 Procenta zastoupení multirezistentní *K. pneumoniae* v rámci Evropy, 2012



Převzato z: EARS-net, ECDC

6.2.6 Terapie

K. pneumoniae je primárně rezistentní pouze k ampicilinu. Terénní kmeny dobře reagují na léčbu cefalosporiny, chinolony, ko-trimoxazolem, případně tetracykliny. Zato nozokomiální kmeny produkující ESBL bývají citlivé pouze ke karbapenemům, ke

kolistinu, a někdy k aminoglykosidům a tigecyklinu. Léčba bývá v tomto případě obtížná (Kolář, 2000).

6.3 *Acinetobacter baumannii*

Bakterie rodu *Acinetobacter* jsou gramnegativní, nepohyblivé a striktně aerobní organizmy volně rozšířené v přírodě, bývají také izolovány z kůže a sliznice zdravých lidí. Od jejich objevení došlo k velkým změnám v jejich taxonomii – dříve byly řazeny do různých rodů, např. *Moraxella*, *Neisseria*, *Bacterium*, atd. V současné době do tohoto rodu patří 19 druhů, ale klinicky a epidemiologicky nejvýznamnějším kmenem je ***Acinetobacter baumannii*** (*A. baumannii*), i když infekce u lidí mohou vyvolat i jiné kmeny (např. *A. ursingii*, *A. haemolyticis*, *A. Iwoffii*, atd.) (Nemec, 2008).

Kmeny se mohou vyskytovat i v komplexech, nejčastěji *A. baumannii* – *A. calcoaceticus*, které je nutné odlišit od ostatních (Votava, 2006).

6.3.1 **Kultivace a biochemie**

A. baumannii je růstově nenáročný, roste tedy na běžných kultivačních půdách. Na krevním agaru vytváří leskle bílé kolonie se slabou hemolýzou (obr. 11). Jelikož se acinetobaktery dají špatně identifikovat podle růstu na půdě, je nutná biochemická identifikace.



Obrázek 11 ***Acinetobacter baumannii*** na krevním agaru

Převzato z: <http://microblog.me.uk/94> [14. 3. 2014]

Biochemicky jsou všechny acinetobaktery nepohyblivé a oxidasa negativní. Také jsou katalasa pozitivní, neredukují nitráty, ONPG test je negativní. Komplex *A. baumannii* – *A. calcoaceticus* je sacharolytický, čímž ho lze odlišit od nesacharolytického *A. Iwoffii*, který může být také nalézán v klinickém materiálu (Votava, 2006).

6.3.2 Patogeneze

A. baumannii má typické vlastnosti **nemocničního patogenu**. Téměř nezpůsobuje primární infekce u zdravých jedinců a jeho výskyt v klinickém materiálu je obvykle výrazem kolonizace, nikoliv infekce. Závažné infekce vyvolává převážně u pacientů v intenzivní péči při asistované ventilaci nebo se zavedenými cévními katétry. Také vyvolává onemocnění u pacientů s kompromitovaným imunitním systémem, poraněných osob, u dětí nebo pacientů s některou z chorob imunitního systému. Je odolný vůči faktorům vnějšího prostředí, např. oproti jiným gramnegativním bakteriím přežívá i v suchu. Infekce acinetobakterem se v poslední době stávají stejně časté a nebezpečné jako onemocnění vyvolaná známými nozokomiálními patogeny, jakými jsou meticilin rezistentní *S. aureus* (MRSA), vankomycin rezistentní *S. aureus* (VRSA), vankomycin rezistentní *Enterococcus* (VRE) apod. (Nemec, 2008), (Julák, 2012).

6.3.3 Rezistence

Poslední genetické výzkumy objasnily, že *A. baumannii* je převážně klonálního charakteru. Multirezistence (MR) je úzce asociována pouze s několika epidemickými klony. V Evropě jsou nejvýznamnější EU klon I, II a III (Dijkshoorn, a další, 1996). V ČR byly izolovány zejména klony I a II (Nemec, 2008).

Mechanismy rezistence jsou u *A. baumannii* stejné jako u ostatních gramnegativních bakterií. Různé mechanismy rezistence u rodu *Acinetobacter* jsou shrnuty v **Tab. 3**.

Tabulka 3 Přehled mechanismů rezistence u rodu *Acinetobacter*

Mechanism of resistance	Genetic mechanisms	Antimicrobials affected
A. Antimicrobial inactivating (hydrolysing) enzymes <ul style="list-style-type: none"> • Amp C Beta-lactamases [<i>Acinetobacter</i>-derived cephalosporinases (ADCs)] • Ambler class D OXA-type enzymes • Ambler class B metallo-β-lactamases (MBLs), such as VIM and IMP • Ambler class A ESBLs (TEM, SHV) 	Chromosomal mediated Insertion sequences ISAb _{a1} and IS ₁₁₃₅ increase production of beta-lactamase Chromosomal and Plasmid mediated Mobile genetic elements Plasmid, chromosomal or mobile genetic elements	Extended spectrum cephalosporins (including 3 rd generation and cephamycin group); cefepime and carbapenems are spared Carbapenems Carbapenems All cephalosporins (including 3 rd generation) except cephamycin group
B. Reduced access to bacterial targets <ul style="list-style-type: none"> • Altered porin channels and other outer membrane proteins 	Point mutations	Carbapenems
C. Mutations that change targets or cellular functions <ul style="list-style-type: none"> • DNA topoisomerase mutations • Aminoglycoside-modifying enzyme • Production of efflux pumps • Modification of cell membrane lipopolysaccharides 	Point mutations in the bacterial targets <i>gyrA</i> and <i>parC</i> topoisomerase enzymes Plasmid, transposons Point mutations Point mutations	Quinolones Aminoglycosides Tigecycline, aminoglycosides, quinolones, tetracyclines Colistin

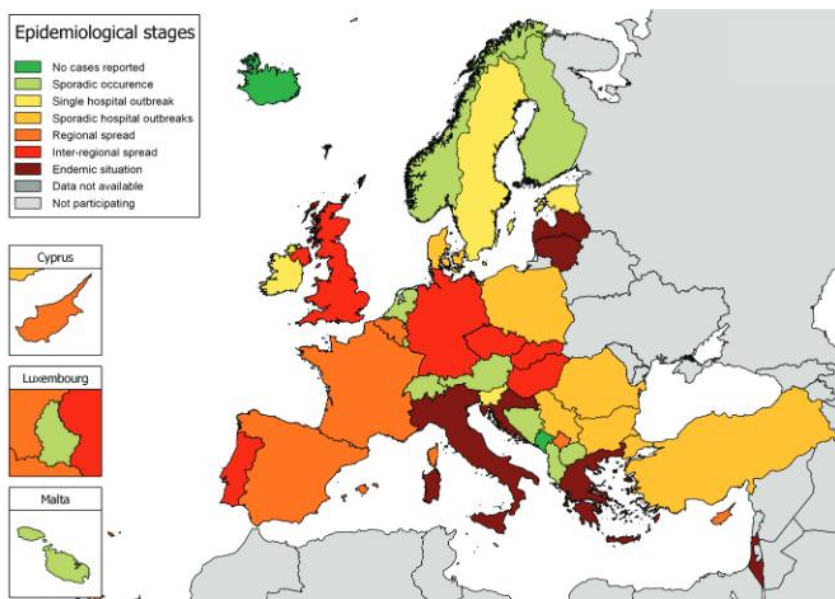
Převzato z: <http://www.ijgid.org/article.asp?issn=0974-777X;year=2010;volume=2;issue=3;spage=291;epage=304;aulast=Manchanda#top>

[17. 3. 2014]

Nejrozšířenějším druhem mechanismu rezistence je inaktivace ATB pomocí enzymu. Acinobaktery tvoří širokou škálu β -laktamas. *A. baumannii* produkuje druhově specifickou **β -laktamasu AmpC** cefalosporinasového typu (**ADC**), která je chromozomálně vázaná. ADC hydrolyzuje cefalosporiny III. generace.

Mohou být také produkovány serinové β -laktamasy karbapenemového typu (karbapenemasy) – jedná se o druhově specifickou β -laktamasu typu D, způsobující rezistenci ke karbapenemům, např. **OXA-51** – dochází k inzerci genu *ISAb_a1*, který nese silný promotor. Dalším příkladem je **OXA-23** způsobující rezistenci k imipenemu (Manchanda, a další, 2010), (Nemec, a další, 2011). **Obr. 12** znázorňuje procentuální zastoupení *A. baumannii* rezistentního ke karbapenemům v rámci zúčastněných zemí v Evropě. Podle mapy je jeho výskyt v ČR mezi-regionální – podle barevného znázornění 6 ze 7 možných.

Obrázek 12 Výskyt *A. baumannii* rezistentního ke karbapenemům v Evropě, založeno na hodnocení expertů dané země, 2013



Převzato z: ECDC – [Technical report – Carbapenemase-producing bacteria in Europe, 2013](#)

6.3.4 Terapie

A. baumannii je přirozeně **rezistentní** k řadě antibiotik, např. k aminopenicilinům, cefalosporinům I. a II. generace a chloramfenikolu (Nemec, 2008).

V **terapii** infekcí způsobených acinetobaktery mají (i v případě účasti polyrezistentních kmenů) solidní naději na úspěch karbapenemy, aminoglykosidy III. generace (amikacin), někdy i fluorované chinolony. Na kmeny, které neprodukují širokospektré β -laktamasy, lze použít i cefalosporiny III. a IV. generace (Votava, 2006).

6.4 *Burkholderia cepacia*

Komplex *Burkholderia cepacia* (BCC) je tvořen nejméně 9 různými druhy bakterií – *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis*, *B. stabilis*, *B. ambifaria*, *B. dolosa*, *B. anthina* a *B. pyrocinia*. Jedná se gramnegativní pohyblivé tyčinky (obr. 13), které byly dříve řazeny vesměs do rodu *Pseudomonas* (Coenye, a další, 2001).

Přirozeným rezervoárem je stojatá i tekoucí voda a půda, ve které většinou působí jako symbiont osídlující kořeny rostlin. Poprvé byla popsána jako patogen u cibule a česneku, kde způsobuje hnilobu (Votava, 2006).



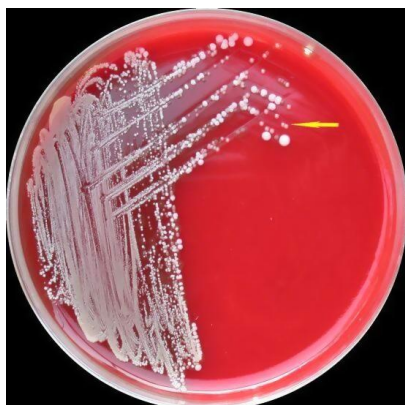
Obrázek 13 Bakterie *Burkholderia cepacia* na snímku ze skenovacího elektronového mikroskopu, zvětšeno 117 000x

Převzato z: <http://cepacia.wz.cz/burkholderia.html> [19. 3. 2014]

6.4.1 Kultivace a biochemie

Kultivačně je *B. cepacia* velmi nenáročná stejně jako pseudomonády, vyroste i na základním živném agaru. Na KA tvoří drobné, žluto-bíle pigmentované kolonie (obr. 14). Optimální kultivační teplota je 30 - 35 °C, důležitá je také dostatečná vlhkost media.

Na McConkeyho a Endově půdě tvoří drobné červené kolonie (laktosa +) s kovovým leskem. Kromě pozitivní laktosy má také pozitivní testy na katalasu a oxidasu (ta může být také opožděně pozitivní) (Coenye, a další, 2001).



Obrázek 14 *Burkholderia cepacia* na krevním agaru

Převzato z: <http://cepacia.wz.cz/burkholderia.html> [19. 3. 2014]

6.4.2 Patogeneze

B. cepacia patří opět mezi **oportunní patogeny**, takže vyvolává onemocnění jen u hostitele s výraznou poruchou imunity. Nejčastěji způsobují **pneumonie** u pacientů s *cystickou fibrózou* (CF - dědičné onemocnění chloridových kanálů, charakteristické je hromadění příliš vazkého hlenu v plicích a pankreatu) nebo *chronickou granulomatózní chorobou* (CGD - vrozené chronické postižení fagocytární funkce polymorfonukleárních leukocytů). Dále může způsobovat **sepse** u pacientů s náhradní umělou chlopní nebo cévními náhradami.

Jedná se o významný **nemocniční patogen**, proto jsou všichni infikovaní pacienti drženi v izolaci od ostatních nemocných, aby u nich nedošlo ke komplikacím.

Pro zdravé osoby představuje pouze malé zdravotní riziko (Marolda, a další, 1999).

6.4.3 Rezistence

BCC jsou rezistentní k řadě antimikrobiálních léčiv. Nepřítomnost vazebných míst na lipopolysacharidu vede k **přirozené rezistenci** BCC ke kationtovým ATB – polymyxinům a aminoglykosidům. BCC mohou být také rezistentní ke všem dostupným β -laktamům v důsledku kombinace impermeability a indukovaných chromozomálních β -laktamas. Vedle přirozeně nízké permeability vnější membrány je popsán nejméně jeden systém effluxní pumpy, který uděluje přirozenou rezistenci k tetracyklinu, chloramfenikolu a k ciprofloxacinu. Potenciální přítomnost více mechanismů rezistence je příčinou multirezistence (EUCAST, 2013).

6.4.4 Léčba

Díky své velké rezistenci proti dostupným ATB se v poslední době jeví jako účinné piperacilin (a jeho chráněná forma s tazobaktamem), ceftazidim, karbopenemy a fluorované chinolony (Votava, 2006).

7 Dezinfekce a sterilizace

7.1 Definice

Dezinfekcí se snažíme přerušit cestu šíření nákazy, a proto nám jde jen o odstranění vegetativních forem původců nákazy pomocí fyzikálních, chemických nebo

kombinovaných postupů; na rozdíl od **sterilizace**, která odstraňuje všechny mikroorganismy (Votava, 2005).

Význam správného provádění dezinfekce a sterilizace roste se stoupajícím výskytem rezistentních až multirezistentních kmenů v nemocničním prostředí a na základě jejich předpokládané adaptaci na jednotlivé účinné látky, obsažené v dezinfekčních prostředcích.

Je nutno dezinfikovat a čistit všechny plochy a předměty, které přijdou do styku s pacientem nebo personálem – jedná se především o nábytek, omyvatelné stěny, umyvadla, sifony, hygienická zařízení a pomůcky k vyšetření a ošetření pacientů. Nutné je také dezinfikovat ruce personálu před a po ošetření pacienta.

Každé oddělení má v rámci hygienicko-epidemiologického režimu vypracován a schválen *Dezinfekční program*, který musí být dodržován a kontrolován (Maďar, a další, 2006).

Veškeré postupy podléhají nařízení vyhlášky č. **195/2005 Sb.**, která byla 1. 10. 2012 novelizována – č. **306/2012 Sb.** - *Vyhláška o podmínkách předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a o hygienických požadavcích na provoz zdravotnických zařízení a ústavů sociální péče (MZČR).*

7.2 Fyzikální dezinfekce

V praxi se z fyzikálních postupů dezinfekce a sterilizace uplatňuje především působení tepla, méně často záření, filtrace a mechanická očista (Tab. 4).

Tabulka 4 **Fyzikální postupy sterilizace a dezinfekce**

Fyzikální postupy sterilizace a dezinfekce	
teplo	záření
plamen	infračervené
horký vzduch (20 min/180°C)	ultrafialové
pára pod tlakem (při přetlaku 1 atm 20 min/121°C)	ionizační
proudící pára	nízkoteplotní plazma
var	filtrace
frakcionovaná sterilizace	mechanická očista
pasterizace	prostý úklid
tyndalizace	

Převzato z: Votava Miroslav (2005), *Lékařská mikrobiologie obecná*, Neptun, Praha, str. 211, ISBN 80-86850-00-5

7.3 Chemická dezinfekce

Pod pojmem **chemické dezinfekce** rozumíme všechny postupy, při kterých se uplatňuje specifický účinek chemických látek na mikroorganismy. Základním vztahem pro chemické postupy je závislost mezi koncentrací použité látky a dobou jejího působení. Obecně platí, že se účinnost dezinfekčních látek se stoupající koncentrací a dobou působení zvyšuje (Votava, 2005). Většina chemických látek se používá ve formě roztoku nebo aerosolu. Materiály se do roztoku ponořují nebo se roztok roztírá po povrchu dezinfikovaného předmětu. Povrchy je možné také postříkovat ve formě aerosolu. Chemické látky lze také do prostředí také odpařovat, páry v uzavřeném prostoru pak zajišťují odpovídající stupeň dezinfekce (Zeman, a další, 2011).

Odolnost jednotlivých typů **mikrobů** se u různých dezinfekčních látek liší. Poměrně citlivé jsou vegetativní formy běžných bakterií a kvasinek. Rozdíly jsou i mezi gram pozitivními a gram negativními bakteriemi: **gramnegativní** (hlavně pseudomonády) jsou dost odolné proti cyklickým sloučeninám a zejména proti povrchově aktivním látkám. Naopak dobře na ně působí alkoholy, těžké kovy, některé organické kyseliny a hlavně alkálie. Mezi **grampozitivními** se za odolnější považují rody *Staphylococcus* a *Enterococcus*. Dezinfekci výrazně odolávají acidorezistentní bakterie (rod *Mycobacterium*), vysoce odolné jsou pak *spory* (Votava, 2005).

Protože na dezinfekční prostředky vzniká jako na ATB postupem času **rezistence**, je nutné dezinfekce přibližně každé dva měsíce obměňovat za jiný prostředek, pocházející z jiné skupiny.

7.3.1 **Spektrum účinnosti dezinfekce**

Spektrum účinnosti u každého dezinfekčního prostředku se uvádí pomocí kombinace jednopísmenných zkratk. Standardizace se provádí pomocí standardních postupů českých technických (ČSN) a evropských norem (EN). Rozsah účinnosti je dán použitou koncentrací a dobou působení přípravku.

A – baktericidní

B – virucidní

M – mykobaktericidní

T – tuberkulocidní

V – fungicidní

C – sporicidní

(BODE.cz)

7.4 Přehled skupin dezinfekčních látek

7.4.1 **Oxidační činidla**

Většina oxidačních činidel působí tak, že odštěpuje atomární kyslík, který porušuje molekulární vazby a tak pravděpodobně nevratně inaktivuje enzymy buňky. Jejich výhodou je, že jsou většinou velmi univerzální a účinné, tj. působí nejen na vegetativní formy ale i na spory a na neobalené viry. Nevýhodou je, že jejich účinnost výrazně snižuje přítomnost bílkovin.

- *peroxosloučeniny* (hlavně kyselina peroctová), *ozon*, *peroxid vodíku* (H_2O_2), *manganistan draselný* ($KMnO_4$), ... (Votava, 2005).

7.4.2 **Halogeny**

Halogeny by bylo možné řadit mezi oxidační činidla, jelikož jsou také založeny na oxidačních procesech, ale většinou se uvádí jako samostatná skupina. Široké uplatnění mají v podobě sloučenin chloru a jodu. Halogenové dezinfekční prostředky jsou dobře účinné na bakterie, kvasinky i plísně. Nižší účinek mohou mít na mykobakterie a spory (účinek kolísá podle použitého preparátu a jeho koncentrace).

- **chlor a jeho deriváty** – *chlor* (dezinfekce pitné vody a odpadních vod), *chlornany* (hrubá dezinfekce – chlorové vápno, SAVO), *chloraminy* (nejběžnější, univerzální – Chloramin B), ...
- **jodové preparáty** – *Lugolův roztok* ($I_2 + KI$), *jodová tinktura* (lihový roztok $I_2 + KI$), *jodofory* (organické sloučeniny, povrchově aktivní, svými mycími vlastnostmi zvyšují účinnost jodu) – celkově dobrá účinnost, barví, mohou alergizovat (CDC, 2009).

7.4.3 **Alkoholy**

Dezinfekční účinek alkoholů spočívá v rychlé denaturaci bílkovin a projeví se jen v přítomnosti vody. Alkoholy ničí vegetativní formy bakterií, některé druhy virů, na spory jsou prakticky neúčinné. Jednou z výhod je rychlé schnutí při povrchové dezinfekci.

- **ethanol** – používá se pouze ředěný ethanol, protože koncentrovaný roztok bakterie spíše konzervuje. Nejúčinnější je přibližně 70 % (w/w) alkohol (pod a nad toto ředění se stává neúčinnějším). Ethanol je součástí řady dezinfekčních prostředků k hygienické a chirurgické dezinfekci rukou. Na běžné bakterie působí okamžitě, na mykobakterie a stafylokoky potřebuje delší expoziční dobu.

- **propanoly** – nejčastěji se používá *n-propanol* a *isopropanol* v koncentracích 50 – 60 %. Většinou určen k dezinfekci rukou, bývá většinou účinnější než ethanol (CDC, 2009).

7.4.4 **Povrchově aktivní látky**

Povrchově aktivní látky (**tenzidy**) snižují povrchové napětí rozpouštědla. Patří mezi ně např. *mýdla* vyráběna z přírodních surovin a synteticky vyráběné *saponáty*. Největší dezinfekční účinky má skupina kationaktivních tenzidů – **kvarténní amoniové sloučeniny (KAS)**.

Antimikrobní účinky těchto látek se vysvětlují porušením buněčné stěny a cytoplazmatické membrány, případně poruchou funkce membránových enzymů (Votava, 2005). Jsou bezbarvé, bez zápachu, termicky stabilní a netoxické (dají se použít na sliznice). KAS jsou obecně aktivnější ke grampozitivním bakteriím, než k těm gramnegativním. Nepůsobí na mykobakterie, pseudomonády, spory a na většinou virů (Blažej, 1977).

- *Ajatin* (benzalkonium chlorid) a *Septonex* (carbethopendecinium bromid) – oba jsou ve formě tinktury a používají se k dezinfekci pokožky, Septonex i jako nosní kapky.

KAS se používají také jako přísady do různých pastilek a sprejů užívaných jako pomocné léčivo při zánětech mandlí, hltanu a dutiny ústní. Vzhledem ke koncentraci je zde jejich antiseptický účinek slabý (Votava, 2005).

7.4.5 **Kombinované přípravky**

Kombinované přípravky využívají synergických účinků různých chemických látek. Většina současně dostupných dezinfekcí obsahuje směs několika látek. Např. k dezinfekci rukou se používá kombinace alkoholů s KAS, H₂O₂, chlorhexidinem apod. Naopak některé látky kombinovat nelze, např. oxidační činidla nebo halogeny se sloučeninami těžkých kovů, nebo KAS s obyčejným mýdlem (Votava, 2005).

7.4.6 **Ostatní přípravky**

Existují i jiné dezinfekční prostředky, ale ty nejsou předmětem této diplomové práce. Jedná se většinou o látky a sloučeniny určené pro plošnou a hrubou dezinfekci. Některé jsou značně toxické.

- *kyseliny a zásady* (KOH, NaOH, čpavek, vodní sklo, ...)
- *alkylační činidla* (etylenoxid, formaldehyd, glutaraldehyd)

- *cyklické sloučeniny* (fenoly, bifenyly)
- *sloučeniny těžkých kovů* (Hg, Ag, Cu, Sn)

7.4.7 **Kontrola účinnosti dezinfekce**

Při používání dezinfekcí je nutné kontrolovat i jejich účinnost. Tu provádí jak samo zdravotnické zařízení v rámci vlastního monitoringu, tak *Orgány ochrany veřejného zdraví (OOVZ)* podle nařízení zákona **258/2000 Sb.** § 17 (novela 223/2013 Sb.). Také se musí kontrolovat přístroje používané ke sterilizacím (Melicharčíková, 2010).

Kontrola chemická

Chemickými postupy se dá zjistit, jestli k pokusu o dezinfekci vůbec došlo a jakým přípravkem (používají se chemické analýzy ke zjištění zbytkového chloru, jodu, apod.). Dále se zjišťuje, zda užívaný pracovní roztok obsahuje účinnou látku v dostatečné koncentraci. Tomu je třeba přizpůsobit odběr vzorku, transport, stanovení obsahu chemických látek a hodnocení výsledků (Melicharčíková, 2010).

Kontrola mikrobiologická

Mikrobiologické postupy slouží k ověření skutečné účinnosti dezinfekčních roztoků na standardních kmenech mikrobů. Používají se vzorky čerstvě naředěných pracovních roztoků dezinfekcí, které se rychle transportují do laboratoře. Zde se kontroluje jejich účinnost jak na sbírkových kmenech, tak na kmenech izolovaných na daném zdravotnickém oddělení. Stanovit lze dezinfekční účinnost baktericidní, bakteriostatickou, fungicidní (vláknité a kvasinkové houby), fungistatickou, tuberkulocidní, mykobaktericidní, sporicidní, sporistatickou a virucidní (obalené a neobalené viry). Testování lze přizpůsobit podmínkám čistého, špinavého, vysoce nebo málo znečištěného prostředí (Melicharčíková, 1998).

Ke kontrole účinnosti se používá tzv. **suspenzní metoda**, kdy se k testované dezinfekci přidává suspenze 10^7 - 10^8 mikrobů (standardně se používají kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* a *Penicillium aurantogriseum*). Po určité době expozice se směs vyočkovává, sleduje se koncentrace roztoků a doba, při které nedošlo k růstu mikrobů.

Pokud jsou zaváděny nové přípravky, musí se suspenzní metodou stanovit také **minimální inhibiční koncentrace (MIC)**, tj. minimální koncentrace, která zastaví růst bakterií; a **minimální baktericidní koncentrace (MBC)** – nejmenší koncentrace přípravku, která bakterie usmrtí (Votava, 2005).

Ke kontrole účinnosti se mohou také používat **metody s nosiči**, při kterých se nějaký standardní povrch (nejčastěji sklo, plast, guma, keramika, ... velikost

25x25 mm) uměle kontaminuje suspenzí mikrobů, nechá zaschnout a aplikuje se dezinfekce. Po určité době expozice se udělá stěr a kultivuje se (Melicharčíková, 2010).

Kontrola fyzikálních parametrů

Pokud se k dezinfekci (sterilizaci) používá přístroj, je nutné kontrolovat také fyzikální parametry. Používají se jak **biologické**, tak **nebiologické indikátory**. Biologické indikátory většinou slouží ke kontrole účinnosti procesu, např. disky s kmenem *Bacillus subtilis*, které se sterilizují a poté se kultivují a hodnotí se případný nárůst. Ty nebiologické se používají ke kontrole parametrů např. tlaku, teploty, času jednoho cyklu, přítomnosti dezinfekčních činidel, apod. (Melicharčíková, 2010).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 Popis metody

Vzorek dezinfekce se přidá k suspenzi testovaných bakterií, po určité době inkubace se účinek dezinfekčního prostředku ukončí přidáním neutralizačního činidla. Po vyočkování a následné kultivaci se zjistí počet přeživších bakterií a vypočítá se logaritmické snížení oproti základní suspenzi. Pokud dojde ke snížení buněk o víc jak 5 log, dezinfekce je účinná.

Celá experimentální část se s menšími změnami (modifikacemi) řídila podle české technické normy **EN 1040 – Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení základního baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik – Metoda zkoušení a požadavky (fáze 1).**

Celá experimentální část byla prováděna na oddělení Ústavu klinické mikrobiologie (ÚKM) FN v Hradci Králové.

9 Použitý materiál

9.1 Testované organismy

- *Pseudomonas aeruginosa* (referenční kmen)
- *Pseudomonas aeruginosa* MR (citlivá pouze ke kolistinu)
- *Klebsiella pneumoniae* ESBL
- *Acinetobacter baumannii* MR (rezistentní ke karbapenemům)
- *Burkholderia cepacia* genomovar *multivorans* MR

Tabulka 5 **Specifikace kmenů**

Kmen	Původ kmene	Pacient	Poznámka	Datum odběru
P. aeruginosa	prostředí		Multirezistence	11. 6. 2013
K. pneumoniae	klinický izolát rána	nar. 1938, I. interní klinika	Produkuje ESBL	2. 9. 2013
B. cepacia group	klinický izolát sputum	nar. 1936, plicní klinika	Multirezistence	24. 10. 2013
A. baumannii	klinický izolát rána	nar. 1947, chirurgická klinika	Produkce β -laktamasy typu OXA multirezistence	9. 7. 2013
P. aeruginosa	CCM 7930, ATCC 15442			

Zkratky a pojmy použité v Tabulce 5:

Multirezistence – rezistence proti třem základním skupinám ATB (betalaktamy, aminoglykosidy, fluorochinolony, kolistin)

CCM – Česká sbírka mikroorganismů (Brno)

ATCC – American Type Culture Collection (Manassas, USA)

ESBL – (extended-spectrum betalactamase) – širokospektrá betalaktamasa typu ESBL

Kmeny byly kromě kultivace dourčeny pomocí biochemické identifikace *VITEK 2* (BioMérieux, Francie).

9.1.1 Citlivost testovaných kmenů k ATB

Tabulka 6 Citlivost kmenů na ATB

kmen	Test	AMI	AMC	AMP	SAM	CZL	FEP	CTX	CTZ	CXM	CIP	GEN
P. aeruginosa	disk	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K. pneumoniae	disk	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	C
B. cepacia	MIC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A. baumannii	MIC	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	C

kmen	Test	IPM	COL	SXT	MER	PTZ	TE	TGC	ETP
P. aeruginosa	disk	R	C	R	R	R	R	R	R
K. pneumoniae	disk	C	C	R	C	R	R	C	C
B. cepacia	MIC	R	R	C	R	C	C	C	R
A. baumannii	MIC	R	C	R	R	R	R	C	R

Zkratky použité v Tabulce 6:

R – rezistentní

C – citlivý

I – intermediálně citlivý

MIC – minimální inhibiční

koncentrace

AMI – amikacin

AMC – amoxycilin-klavulonát

AMP – ampicilin

SAM – ampicilin-sulbaktam

CZL – cefazolin

FEP – cefepim

CTX – cefotaxim

CTZ – ceftazidim

CXM – cefuroxim

CIP – ciprofloxacín

GEN – gentamycin

IPM – imipenem

COL – kolistin

SXT – trimethoprim-sulfonamid

MER – meropenem

PTZ – piperacilin-tazobaktam

TE – tetracyklin

TGC – tigecyklin

ETP – ertapenem

Tabulka 7 Soupravy použité pro stanovení citlivosti

stanovení citlivosti na ATB	metodika dle	Breakpointy dle	výrobce
disková difúzní citlivost	EUCAST	EUCAST, CLSI	agary TRIOS CZ, ATB disky Oxoid
MIC - diluční mikrometoda	EUCAST	EUCAST, CLSI	destičky TRIOS CZ

Zkratky použité v **Tabulce 7**:

EUCAST – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Basel, Švýcarsko)

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (Wayne, USA)

MIC – minimální inhibiční koncentrace

9.2 Testované dezinfekce

• **Manusept® Basic**

- *výrobce* – Hartmann – Rico a.s.
- *číslo šarže/exspirace* – 348295 / Ex 10/2016
- *vzhled vzorku* – čirý, bezbarvý roztok
- *skladovací podmínky* – skladovat při pokojové teplotě, bez přístupu slunečního záření, ne v blízkosti topných zařízení
- *aktivní složka/y a jejich koncentrace* – 100 g roztoku obsahuje: *účinné látky*: **ethanol 99 % 80 g**; *pomocné látky*: butan-2-on, aqua purificata, heptamethylnonan, (2-ethylhexyl)(2-ethylhexanoat), tetradecan-1-ol, (RS)-5-oxo-pyrrolidin-2-carboxylic acid, sodium salt
- *mikrobiologická účinnost* – **AB₁ - TMV** => baktericidní (vč. MRSA), fungicidní na kvasinky, tuberculocidní, virucidní na obalené viry (vč. HBV, HIV, HCV, *Vacciniavirus*), účinný proti rotavirům
- *doba expozice* - hygienická dezinfekce rukou (30 s), chirurgická dezinfekce rukou (3 min)
- *použití* – tento výrobek se nejčastěji používá pro hygienickou a chirurgickou dezinfekci rukou (jak v nemocnicích, ambulancích, tak v domácí péči o pacienty)
- *zdroj* - Ústav klinické mikrobiologie FN HK

• **Sterillium® Med**

- *výrobce* – Hartmann – Rico a.s.
- *číslo šarže/exspirace* – 361572 / Ex 09/2016
- *vzhled vzorku* – čirý roztok světle modré barvy
- *skladovací podmínky* – skladovat při pokojové teplotě v temnu
- *aktivní složka/y a jejich koncentrace* – 100 g roztoku obsahuje: *účinné látky*: **ethanol 85 g**; *pomocné látky*: butan-2-on, glycerol 85 %, tetradecan-2-ol, propan-1-ol, aqua purificata
- *mikrobiologická účinnost* – **AB₁ – TMV** => baktericidní (vč. *Listeria spp.* a *Salmonella spp.*), virucidní na obalené viry (vč. HBV, HIV, HCV + účinný na

adeno-, polio-, rota- a chřipkové viry), tuberkulocidní (*Mycobacterium terrae*), fungicidní (*Candida albicans*)

- *doba expozice* – hygienická dezinfekce rukou (30 s), chirurgická dezinfekce rukou (1,5 min)
- *použití* – tento výrobek se nejčastěji používá pro hygienickou a chirurgickou dezinfekci rukou (jak v nemocnicích, ambulancích, tak v domácí péči o pacienty)
- *zdroj* - Ústav klinické mikrobiologie FN HK

- **Cleanisept®**

- *výrobce* – Dr. Schumacher GmbH
- *číslo šarže/exspirace* – 420323 / Ex 05/2016
- *vzhled vzorku* – čirý bezbarvý roztok, pěnění
- *skladovací podmínky* – pokojová teplota, temno
- *aktivní složka/y a jejich koncentrace* – 100 g přípravku obsahuje: 3,33 g didecyldimethylamoniumchlorid, 6,66 g **kvartérní amoniové soli** (KAS), benzyl C₁₂₋₁₆ alkyldimethylchlorid, neiontové **povrchově aktivní látky** 5 – 15 %. Povrchově aktivní látky obsažené v přípravku jsou biologicky rozložitelné.
- *mikrobiologická účinnost* – **ABV** => baktericidní (vč. MRSA), fungicidní (*Candida albicans*), virucidní (vč. HBV, HIV, HCV, také účinný na papova – polyoma, rota- a chřipkové viry)
- *ředění* – v laboratoři používané 1 % roztok
- *doporučené ředidlo* – destilovaná voda
- *doba expozice* – 15 min
- *použití* – jedná se o kombinovaný dezinfekční prostředek, který se používá k dezinfekci a mytí diagnostických pomůcek a povrchů
- *zdroj* - Ústav klinické mikrobiologie FN HK

- **Descosept AF**

- *výrobce* – Dr. Schumacher GmbH
- *číslo šarže/exspirace* – 434805 / Ex 07/2018
- *vzhled vzorku* – čirý bezbarvý roztok
- *skladovací podmínky* – pokojová teplota bez přístupu světla
- *aktivní složka/y a jejich koncentrace* – 100 g přípravku obsahuje: 42,0 g **ethanol**, 0,05 g didecyldimethylamoniumchlorid (**KAS**)

- *mikrobiologická účinnost* – **ABTV** => baktericidní (vč. MRSA), tuberkulocidní, fungicidní (*Candida albicans*), virucidní (vč. HBV, HIV, HCV, také rota-, noro-, vaccinia-, a chřipkové viry)
- *doba expozice* – 1 min
- *použití* - kombinovaný dezinfekční prostředek, který se používá k dezinfekci malých ploch, povrchů a diagnostických pomůcek
- *zdroj* – Ústav klinické mikrobiologie FN HK

- **Softasept® N**

- *výrobce* – B. Braun Medical s.r.o.
- *číslo šarže/expirace* – 1336M15 / Ex 08/2018
- *vzhled vzorku* – červený roztok
- *skladovací podmínky* – pokojová teplota
- *aktivní složka/y a jejich koncentrace* – 100 g přípravku obsahuje: 74,1 g **ethanol** (100 %), 10 g propan-2-ol
- *mikrobiologická účinnost* – **ABVMT** => baktericidní, virucidní, fungicidní, tuberkulocidní
- *doba expozice* – 15 s před vpichem; 1 min před operací, lumbální punkcí, punkcí kloubů, ...
- *použití* – dezinfekce kůže
- *zdroj* – IV. Interní hematologická klinika FN HK

- **Septoderm**

- *výrobce* – Biochemie Group a.s.
- *číslo šarže/expirace* – 001A140107 / Ex 01/2017
- *vzhled vzorku* – čirý bezbarvý roztok
- *skladovací podmínky* – pokojová teplota
- *aktivní složka/y a jejich koncentrace* – 100 g přípravku obsahuje: 45 g **ethanol**, 30 g **isopropanol**, < 0,5 g didecyldimethylamoniumchlorid
- *mikrobiologická účinnost* – **ABTMV** => baktericidní (vč. MRSA), plně virucidní, fungicidní, mykobaktericidní, tuberkulocidní
- *doba expozice* – hygienická dezinfekce (30 s), chirurgická dezinfekce (2 x 1,5 min)
- *použití* – používá se k hygienické a chirurgické dezinfekci rukou, dezinfekci kůže před vpichem, operací, ...
- *zdroj* – IV. interní hematologická klinika FN HK

9.3 Kultivační media a reagentie

- Columbia krevní agar s 5 % defibrilované ovčí krve
 - komerčně vyrobené, firma TRIOS s.r.o. (Praha, ČR)
- diluent – fyziologický roztok (FzR) s 0,89 % NaCl
- neutralizátor - zde použit čerstvý žloutek – 5 % roztok

Pozn.: vše temperováno na 20 °C

9.4 Ostatní pomůcky

- sterilizátor – horkovzdušný – sklo 160 °C, 1 h; špičky 120 °C, 1 h
- vodní lázeň 20 ± 1 °C – nahrazeno temperancí odstáním v laboratoři
- termostat – 35 – 38 °C
- třepačka zn. Vortex (multi)
- lednice – 2 – 8 °C
- denzitometr pro měření zákalu suspenze
- stopky
- dávkovač na fyziologický roztok
- jednorázové plastové sterilní zkumavky s víčkem
- laboratorní sklo na přípravu roztoků dezinfekcí při jejich ředění (odměrné baňky, kádinky)
- automatické pipety – 20 – 200 ul, 100 – 1000 ul
- špičky na automatické pipety
- skleněné korálky o velikosti 3 – 4 mm
- pasteurova pipeta

10 Popis pracovního postupu

10.1 Suspenze testovaných organismů a validace

1) Příprava pracovní kultury

- ze zmraženého kmene se připraví pracovní vzorek, který se vyočkuje na kultivační půdu
 - vytvoří se postupným přeočkováním 2. a 3. subkultura (z primárního vzorku -> 1. subkultura -> 2. subkultura) – další subkultury se nedoporučují používat
 - subkultura použitelná 48 h při uchování v termostatu
- vzorky izolované od pacientů se také vyočkují a připraví se subkultury, zbytek vzorku se zamrazí (- 80 °C)

2) Příprava základní suspenze „N“

- do 100 ml odměrné baňky se dá 10 ml FzR + 5 g skleněných korálků + jedna klička kolonií z pracovní subkultury daného kmene – nejprve se rozetřou kličkou o vlhkou stěnu, pak smíchají s tekutinou
- protřepat 3 min na třepačce
- pomocí Pasteurovy pipety se vysaje suspenze z korálků a přenesse do sterilní zkumavky
- pomocí FzR se naředí na $1,5 \times 10^8 - 5 \times 10^8$ CFU/ml (v zákalové jednotce je to 0,5 – 1,6 dle McF) (převod jednotek Tab. 8)

Tabulka 8 Převod jednotek mezi 10^8 a zákalovými jednotkami dle McFarlanda (v 1 ml)

McF	0,5	1	2	3	4
10^8 CFU	1,5	3	6	9	12

Převzato z: Veterinární a Farmaceutická fakulta, Brno – [praktika č. 5](#) [23. 3. 2014]

- udržet při 20 °C, spotřebovat do 2 h
- pro počítání se připraví ředění 10^{-6} a 10^{-7} (tj. počet buněk 10^2 a 10^1), vzorek každého ředění se vyočkuje v duplikátu na KA, kultivace

Pozn.: Možno použít 2 typy očkování:

- pokud nemáme komerčně vyrobené půdy, dá se 1 ml suspenze do petriho misky a přelije se to 15 - 20 ml agarů ochlazeného na 45 °C
- v našem případě jsme nanášeli 1 ml suspenze rozdělený na 500 a 500 ul na hotový agar

3) Validační suspenze „Nv“

- základní suspenze „N“ se naředí FzR na $3,0 \times 10^2 - 1,6 \times 10^3$ CFU/ml
- pro počítání se poté vytvoří ředění 10^{-1} , opět se očkuje v duplikátu na KA, kultivace

4) Kultivace a počítání testované a validační suspenze

- plotny se inkubují **20 – 24 h**; vyřadí se všechny, které nejsou z jakéhokoliv důvodu počitatelné
- po inkubaci se spočítají kolonie a určí se počet CFU, poté se plotny kultivují dalších 20 – 24 h
- plotny, které mají dobře oddělené kolonie, se už nepřečítávají, přepočítají se jen zbývající plotny – pokud došlo k nárůstu kolonií, používají se pro další výpočty jen vyšší čísla
- **limitní hodnoty** jsou **14 – 330** => pokud je hodnota kolonií větší než 330 zapisuje se ≥ 330 , pokud je menší jak 14, zapisuje se ≤ 14

5) Příprava vzorků dezinfekce

- pro testování účinnosti 3 koncentrace dezinfekcí
 - o účinná (používaná v provozu) **1**
 - o intermediální **1:1**
 - o neúčinná **1:5**
- 1. i 2. koncentrace by měly způsobit snížení kolonií o více jak 5 log
- k ředění se používá destilovaná/injekční voda (sterilní)
- u pevných vzorků se připraví roztok
- ředěný roztok musí být vždy čerstvě připraven a spotřebován do 2 h, uchovávat při 20 °C

Pozn.: pokud při ředění dojde ke změnám vzorku (např. vyvločkování, zakalení), vše musí být zaznamenáno

10.2 Postup pro stanovení baktericidní aktivity přípravku

10.2.1 *Experimentální podmínky*

- **Teplota (°C)**

- povinná teplota při experimentu je **20 ± 1 °C**

- **Kontaktní čas (min)**
 - **vybrané časy** – 30 s, 1 min, 2 min a 5 min
 - povolená odchylka je ± 10 s, při kontaktním čase 1 min a míň je to ± 5 s
- **Testované organismy**
 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 7930, *Pseudomonas aeruginosa* MR, *Klebsiella pneumoniae* ESBL+, *Acinetobacter baumannii* MR a *Burkholderia cepacia* MR

10.2.2 Výběr zkušební metody

- na základě technických možností laboratoře byla vybrána **dilučně-neutralizační metoda**

10.2.3 Výběr neutralizátoru

- neutralizační činidlo se po určité době přidává ke směsi dezinfekce a suspenze, aby neutralizovalo účinek dezinfekčního prostředku
- postup pro zjištění jeho účinnosti je proto opačný, než při klasickém testu dezinfekcí =>
 - 4 ml dezinfekce + 1 ml FzR - protřepat
 - odebrat 0,5 ml z této směsi, přenést do nové zkumavky, přidat 4 ml neutralizátoru
 - po 5 min přidat 0,5 ml základní suspenze „N“, promíchat, nechat odstát a v duplikátu vyočkovat na KA
 - kultivace, počítání kolonií
 - cílem testu je, aby kolonie na půdě vyrostly => neutralizátor inhiboval účinek dezinfekce
- v testu prošel pouze **5 % roztok vaječného žloutku**

10.2.4 Všeobecné pokyny k validaci a kontrole postupů

Metoda se kontroluje a validuje pouze pro nejvyšší zkušební koncentraci vzorku – pro každý z použitých kmenů a pro všechny experimentální podmínky (teplota, doba kontaktu). Dále se provádí kontrola experimentálních podmínek „A“, kontrola toxicity neutralizátoru „B“ a způsobu validace „C“.

10.2.5 Dilučně-neutralizační metoda

1) Test „Na“

- do zkumavky se napipetuje 0,5 ml vody + 0,5 ml suspenze testovaného kmene, nechá se odstát 2 min ± 10 s
- poté se přidá 4 ml jednoho vzorku dezinfekce, vše se promíchá a nechá inkubovat 5 min ± 10 s
- na konci kontaktní doby se zkumavka opět promíchá, odebere se 0,5 ml směsi a přidá se do čisté zkumavky ke 4 ml neutralizačního roztoku, promíchá se a nechá odstát dalších 5 min ± 10 s
- poté se promíchá a 1 ml vyočkuje v duplikátu na KA
- kultivace 24 h, 37 °C
- celý postup provést pro každé ředění dezinfekce, pro každý kontaktní čas a pro všechny testované organismy

2) Kontrola experimentálních podmínek „A“

- cílem je zjištění jakéhokoliv letálního vlivu, který by se mohl během experimentu objevit
- do zkumavky se napipetuje 0,5 ml vody + 0,5 ml validační suspenze „Nv“, promíchá se, inkubace 2 min ± 10 s
- přidá se 4 ml vody, promíchá se, inkubace 5 min ± 10 s
- po promíchání vyočkování 1 ml na KA, kultivace

3) Kontrola neutralizačního činidla „B“

- cílem je ověření (ne)přítomnosti toxicity neutralizátoru
- do zkumavky se napipetuje 4 ml neutralizátoru (5 % vaječný žloutek) + 0,5 ml vody + 0,5 ml suspenze, promíchat a nechá se inkubovat 5 min ± 10 s
- vyočkovat 1 ml v duplikátech na KA, kultivace

4) Validace „C“

- do zkumavky se napipetuje 0,5 ml vody + 0,5 ml diluentu (FzR), spustí se stopky a přidá se 4 ml testované dezinfekce v nejvyšší použité koncentraci, promíchat, inkubace 5 min ± 10 s
- promíchat znovu
- odebere se 0,5 ml směsi do nové zkumavky obsahující 4 ml neutralizačního činidla, promíchat a inkubace 5 min ± 10 s
- poté se přidá 0,5 ml testované suspenze, promíchat a inkubace 30 ± 1 min
- znovu vše promíchat, v duplikátech vyočkovat na KA, inkubace

10.3 Výpočty

N , N_v , N_0 , N_{v0} , N_a a A , B , C představují počet buněk spočítaných na 1 ml v různých typech suspenzí (Tab. 9)

Tabulka 9 Počet buněk spočítaných na 1 ml v různých testovaných směsích

	Počet bb. v ml bakteriální suspenze	Počet bb. v ml testované směsi na začátku kontaktního času ($t = 0$)	Počet přeživších bb. v ml testované směsi na konci kontaktního času nebo po 5 min (B) nebo 30 min (C)
Test	N testovaná suspenze	$N_0 (= N/10)$	N_a (před neutralizací)
Kontroly	N_v kontrolní suspenze	$N_{v0} (= N_v/10)$	A, B, C

1) Stanovení V_c hodnot

- u dilučně-neutralizační metody udává V_c hodnota počet útvarů tvořících kolonie – počítá se na 1 ml
- obvyklé limity pro počítání bakterií na agarových plotnách se pohybují mezi 15 a 300, ale v Evropské normě je akceptována odchylka 10% => limit **14 – 330**
- pokud byl 1 ml rozočkován na více ploten – zaznamenat, hodnoty se sčítají!!!
- když je počet kolonií na plotně větší než 330 píše se >330, pokud je to méně než 14, píše se <14 (pokud je 1 ml vzorku použit na více ploten a jedna má >330, po sečtení se V_c zapíše >xx)

2) Výpočet N a N_0

- N je počet buněk v testované suspenzi

$$N = \frac{C}{(n_1 + 0,1 n_2) 10^{-6}}$$

kde

- C je součet hodnot V_c , které byly vzaty v úvahu
- n_1 je počet hodnot V_c vzatých v úvahu u nižšího ředění, tj. 10^{-6}
- n_2 je počet hodnot V_c vzatých v úvahu u vyššího ředění, tj. 10^{-7}
- 10^{-6} je ředící faktor odpovídající nižšímu ředění

- N_0 je počet buněk na ml testované směsi na začátku doby kontaktu ($t = 0$)

$$N_0 = N/10$$

Pozn.: dělí se 10 kvůli 10-násobnému zředění přidáním vody a dezinfekce

3) Výpočet N_a

- N_a vyjadřuje počet přeživších bakterií na ml na konci inkubační doby

$$N_a = 10 c/n$$

kde

c je součet hodnot V_c vzatých v úvahu

n je počet hodnot V_c vzatých v úvahu

4) Výpočet N_v a N_{v_0}

- N_v je počet buněk na ml v kontrolní suspenzi
- N_{v_0} je počet buněk na ml směsi A , B nebo C na začátku doby kontaktu ($t = 0$)

$$N_v = 10 c/n$$

$$N_{v_0} = c/n$$

kde

c součet V_c hodnot vzatých v úvahu

n je počet V_c hodnot vzatých v úvahu

5) Výpočet A , B a C

- A , B a C jsou počty přeživších kolonií v experimentálních podmínkách kontroly A , kontroly neutralizátoru B nebo při validaci C
- odpovídají průměrné hodnotě V_c směsí A , B a C , které byly vzaty v úvahu

$$A, B, C = c/n$$

kde

c součet V_c hodnot vzatých v úvahu

n je počet V_c hodnot vzatých v úvahu

6) Výpočet redukce

$$\log x \text{ CFU/ml}$$

- u každé koncentrace výrobku a jednotlivých experimentálních podmínek se srovnává hodnota N_0 a N_a

$$\log R = \log N_0 - \log N_a$$

- pokud dojde ke snížení o více jak 5 log, dezinfekce je účinná

7) Základní limity

a) N je mezi $1,5 \times 10^8$ a $5,0 \times 10^8$ ($8,17 \leq \log N \leq 8,70$)

N_0 je mezi $1,5 \times 10^7$ a $5,0 \times 10^7$ ($7,17 \leq \log N_0 \leq 7,70$)

b) N_{v_0} je mezi 30 a 160 ($3,0 \times 10^1$ a $1,6 \times 10^2$)
(N_v je mezi $3,0 \times 10^2$ a $1,6 \times 10^3$)

c) A, B, C se rovná nebo je větší než $0,5 \times N_{v_0}$

11 Výsledky

V následujících tabulkách jsou nejprve shrnuty výsledky vypočtených CFU v základních suspenzích (Tab. 10), výsledky validace (Tab. 11 - 15), a posléze také výsledky vlastního experimentu (Tab. 16 - 21).

11.1 Výpočet CFU v základní suspenzi

Tabulka 10 Přehled množství kolonií v 1 ml

Pseudomonas aeruginosa CCM 7930						
Testovaná suspenze (N a N ₀)	N	Vc1	Vc2	\bar{x}_{wm}	2,09E+8 cfu/ml	
	10 E-6	168	214	$N_0 = N / 10 \times \lg$	7,32	
	10 E-7	35	43	$7,17 \leq N_0 \leq 7,70$	ano	ne
Klebsiella pneumoniae ESBL+						
Testovaná suspenze (N a N ₀)	N	Vc1	Vc2	\bar{x}_{wm}	3,46E+8 cfu/ml	
	10 E-6	312	298	$N_0 = N / 10 \times \lg$	7,54	
	10 E-7	62	90	$7,17 \leq N_0 \leq 7,70$	ano	ne
Pseudomonas aeruginosa MR						
Testovaná suspenze (N a N ₀)	N	Vc1	Vc2	\bar{x}_{wm}	3,57E+8 cfu/ml	
	10 E-6	315	327	$N_0 = N / 10 \times \lg$	7,55	
	10 E-7	57	86	$7,17 \leq N_0 \leq 7,70$	ano	ne
Acinetobacter baumannii MR						
Testovaná suspenze (N a N ₀)	N	Vc1	Vc2	\bar{x}_{wm}	3,16E+8 cfu/ml	
	10 E-6	260	320	$N_0 = N / 10 \times \lg$	7,50	
	10 E-7	59	56	$7,17 \leq N_0 \leq 7,70$	ano	ne
Burkholderia cepacia MR						
Testovaná suspenze (N a N ₀)	N	Vc1	Vc2	\bar{x}_{wm}	3,36E+8 cfu/ml	
	10 E-6	315	297	$N_0 = N / 10 \times \lg$	7,53	
	10 E-7	69	58	$7,17 \leq N_0 \leq 7,70$	ano	ne

11.2 Výsledky validace

Tabulka 11 Výsledky validace *Pseudomonas aeruginosa* CCM 7930

Validace testované suspenze (N _{v0})			Kontrola experimentálních podmínek (A)			Kontrola toxicity neutr. činidla (B)			Validace neutralizátoru testovanou konc. 1; 5 min (C)		
Vc1	90	82,5	Vc1	72	67,5	Vc1	74	77	Vc1	99	102
Vc2	75		Vc2	63		Vc2	80		Vc2	105	
30 ≤ \bar{x} N _{v0} ≤ 160 ?			\bar{x} A ≥ 0,5* \bar{x} N _{v0} ?			\bar{x} B ≥ 0,5* \bar{x} N _{v0} ?			\bar{x} C ≥ 0,5* \bar{x} N _{v0} ?		
ano		ne	ano		ne	ano		ne	ano		ne

Tabulka 12 Výsledky validace *Klebsiella pneumoniae* ESBL+

Validace testované suspenze (N_{V_0})			Kontrola experimentálních podmínek (A)			Kontrola toxicity neutr. činidla (B)			Validace neutralizátoru testovanou konc. 1; 5 min (C)		
Vc1	115	108,5	Vc1	98	89,5	Vc1	106	105	Vc1	112	117,5
Vc2	102		Vc2	81		Vc2	104		Vc2	123	
$30 \leq \bar{x} N_{V_0} \leq 160 ?$			$\bar{x} A \geq 0,5^* \bar{x} N_{V_0} ?$			$\bar{x} B \geq 0,5^* \bar{x} N_{V_0} ?$			$\bar{x} C \geq 0,5^* \bar{x} N_{V_0} ?$		
ano		ne	ano		ne	ano		ne	ano		ne

Tabulka 13 Výsledky validace *Pseudomonas aeruginosa* MR

Validace testované suspenze (N_{V_0})			Kontrola experimentálních podmínek (A)			Kontrola toxicity neutr. činidla (B)			Validace neutralizátoru testovanou konc. 1; 5 min (C)		
Vc1	120	117,5	Vc1	69	71	Vc1	96	104,5	Vc1	86	86,5
Vc2	115		Vc2	73		Vc2	113		Vc2	87	
$30 \leq \bar{x} N_{V_0} \leq 160 ?$			$\bar{x} A \geq 0,5^* \bar{x} N_{V_0} ?$			$\bar{x} B \geq 0,5^* \bar{x} N_{V_0} ?$			$\bar{x} C \geq 0,5^* \bar{x} N_{V_0} ?$		
ano		ne	ano		ne	ano		ne	ano		ne

Tabulka 14 Výsledky validace *Acinetobacter baumannii* MR

Validace testované suspenze (N_{V_0})			Kontrola experimentálních podmínek (A)			Kontrola toxicity neutr. činidla (B)			Validace neutralizátoru testovanou konc. 1; 5 min (C)		
Vc1	136	125	Vc1	102	105	Vc1	99	95	Vc1	104	100,5
Vc2	114		Vc2	108		Vc2	91		Vc2	97	
$30 \leq \bar{x} N_{V_0} \leq 160 ?$			$\bar{x} A \geq 0,5^* \bar{x} N_{V_0} ?$			$\bar{x} B \geq 0,5^* \bar{x} N_{V_0} ?$			$\bar{x} C \geq 0,5^* \bar{x} N_{V_0} ?$		
ano		ne	ano		ne	ano		ne	ano		ne

Tabulka 15 Výsledky validace *Burkholderia cepacia* MR

Validace testované suspenze (N_{V_0})			Kontrola experimentálních podmínek (A)			Kontrola toxicity neutr. činidla (B)			Validace neutralizátoru testovanou konc. 1; 5 min (C)		
Vc1	120	117	Vc1	112	113,5	Vc1	97	91,5	Vc1	102	106,5
Vc2	114		Vc2	115		Vc2	86		Vc2	111	
$30 \leq \bar{x} N_{V_0} \leq 160 ?$			$\bar{x} A \geq 0,5^* \bar{x} N_{V_0} ?$			$\bar{x} B \geq 0,5^* \bar{x} N_{V_0} ?$			$\bar{x} C \geq 0,5^* \bar{x} N_{V_0} ?$		
ano		ne	ano		ne	ano		ne	ano		ne

11.3 Výsledky experimentu

Tabulka 16 Výsledky Manusept® Basic

Tato dezinfekce vykazuje účinnost u všech testovaných kmenů

Kmen	Konc.	čas (min)	log Redukce	Kmen	Konc.	čas (min)	log Redukce
Pseudomonas aeruginosa CCM 7930	1	0,5	>5,17	Pseudomonas aeruginosa MR	1	0,5	>5,40
		1	>5,17			1	>5,40
		2	>5,17			2	>5,40
		5	>5,17			5	>5,40
	1:1	0,5	>5,17		1:1	0,5	>5,40
		1	>5,17			1	>5,40
		2	>5,17			2	>5,40
		5	>5,17			5	>5,40
	1:5	0,5	<3,80		1:5	0,5	<4,03
		1	<3,80			1	<4,03
		2	<3,80			2	<4,03
		5	<3,80			5	4,73
Klebsiella pneumoniae ESBL+	1	0,5	>5,39	Acinetobacter baumannii MR	1	0,5	>5,35
		1	>5,39			1	>5,35
		2	>5,39			2	>5,35
		5	>5,39			5	>5,35
	1:1	0,5	>5,39		1:1	0,5	>5,35
		1	>5,39			1	>5,35
		2	>5,39			2	>5,35
		5	>5,39			5	>5,35
	1:5	0,5	<4,02		1:5	0,5	<3,98
		1	<4,02			1	<3,98
		2	<4,02			2	<3,98
		5	<4,02			5	<3,98
Burkholderia cepacia group MR	1	0,5	>5,38				
		1	>5,38				
		2	>5,38				
		5	>5,38				
	1:1	0,5	>5,38				
		1	>5,38				
		2	>5,38				
		5	>5,38				
	1:5	0,5	<4,01				
		1	<4,01				
		2	<4,01				
		5	<4,01				

Použité zkratky: *Konc.* - koncentrace

Tabulka 17 Výsledky Sterillium® Med

Tato dezinfekce vykazuje účinnost u všech testovaných kmenů

Kmen	Konc.	čas (min)	log Redukce	Kmen	Konc.	čas (min)	log Redukce
Pseudomonas aeruginosa CCM 7930	1	0,5	>5,17	Pseudomonas aeruginosa MR	1	0,5	>5,40
		1	>5,17			1	>5,40
		2	>5,17			2	>5,40
		5	>5,17			5	>5,40
	1:1	0,5	>5,17		1:1	0,5	>5,40
		1	>5,17			1	>5,40
		2	>5,17			2	>5,40
		5	>5,17			5	>5,40
	1:5	0,5	<3,80		1:5	0,5	<4,03
		1	<3,80			1	<4,03
		2	<3,80			2	<4,03
		5	<3,80			5	<4,03
Klebsiella pneumoniae ESBL+	1	0,5	>5,39	Acinetobacter baumannii MR	1	0,5	>5,35
		1	>5,39			1	>5,35
		2	>5,39			2	>5,35
		5	>5,39			5	>5,35
	1:1	0,5	>5,39		1:1	0,5	>5,35
		1	>5,39			1	>5,35
		2	>5,39			2	>5,35
		5	>5,39			5	>5,35
	1:5	0,5	<4,02		1:5	0,5	<3,98
		1	<4,02			1	<3,98
		2	<4,02			2	<3,98
		5	<4,02			5	<3,98
Burkholderia cepacia group MR	1	0,5	>5,38				
		1	>5,38				
		2	>5,38				
		5	>5,38				
	1:1	0,5	>5,38				
		1	>5,38				
		2	>5,38				
		5	>5,38				
	1:5	0,5	<4,01				
		1	<4,01				
		2	<4,01				
		5	<4,01				

Použité zkratky: *Konc.* - koncentrace

Tabulka 18 **Výsledky Cleanisept®**

Dezinfekce vykazuje účinnost u všech testovaných kmenů, v některých případech i při ředění 1:5

Kmen	Konc.	čas (min)	log Redukce	Kmen	Konc.	čas (min)	log Redukce
Pseudomonas aeruginosa CCM 7930	1	0,5	>5,17	Pseudomonas aeruginosa MR	1	0,5	>5,40
		1	>5,17			1	>5,40
		2	>5,17			2	>5,40
		5	>5,17			5	>5,40
	1:1	0,5	>5,17		1:1	0,5	5,32
		1	>5,17			1	>5,40
		2	>5,17			2	>5,40
		5	>5,17			5	>5,40
	1:5	0,5	4,93		1:5	0,5	4,87
		1	>5,17			1	5,13
		2	>5,17			2	>5,40
		5	>5,17			5	>5,40
Klebsiella pneumoniae ESBL+	1	0,5	5,03	Acinetobacter baumannii MR	1	0,5	>5,35
		1	>5,39			1	>5,35
		2	>5,39			2	>5,35
		5	>5,39			5	>5,35
	1:1	0,5	>5,39		1:1	0,5	>5,35
		1	>5,39			1	>5,35
		2	>5,39			2	>5,35
		5	>5,39			5	>5,35
	1:5	0,5	4,73		1:5	0,5	4,69
		1	4,93			1	4,89
		2	>5,39			2	>5,35
		5	>5,39			5	>5,35
Burkholderia cepacia group MR	1	0,5	>5,38				
		1	>5,38				
		2	>5,38				
		5	>5,38				
	1:1	0,5	>5,38				
		1	>5,38				
		2	>5,38				
		5	>5,38				
	1:5	0,5	>5,38				
		1	>5,38				
		2	>5,38				
		5	>5,38				

Použité zkratky: *Konc.* – koncentrace

Tabulka 19 **Výsledky Descosept AF**

Dezinfekce je účinná u všech testovaných kmenů

Kmen	Konc.	čas (min)	log Redukce	Kmen	Konc.	čas (min)	log Redukce
Pseudomonas aeruginosa CCM 7930	1	0,5	>5,17	Pseudomonas aeruginosa MR	1	0,5	>5,40
	1		>5,17		1		>5,40
	2		>5,17		2		>5,40
	5		>5,17		5		>5,40
	1:1	0,5	5,04		1:1	0,5	>5,40
	1		>5,17		1		>5,40
	2		>5,17		2		>5,40
	5		>5,17		5		>5,40
	1:5	0,5	4,2		1:5	0,5	4,5
	1		4,28		1		4,73
	2		4,52		2		5,11
	5		4,79		5		5,36
Klebsiella pneumoniae ESBL+	1	0,5	>5,39	Acinetobacter baumannii MR	1	0,5	>5,35
	1		>5,39		1		>5,35
	2		>5,39		2		>5,35
	5		>5,39		5		>5,35
	1:1	0,5	5,25		1:1	0,5	5,18
	1		5,27		1		5,28
	2		5,35		2		>5,35
	5		>5,39		5		>5,35
	1:5	0,5	<4,02		1:5	0,5	4,37
	1		4,2		1		4,46
	2		4,52		2		4,53
	5		4,82		5		4,7
Burkholderia cepacia group MR	1	0,5	>5,38				
	1		>5,38				
	2		>5,38				
	5		>5,38				
	1:1	0,5	>5,38				
	1		>5,38				
	2		>5,38				
	5		>5,38				
	1:5	0,5	5,35				
	1		>5,38				
	2		>5,38				
	5		>5,38				

Použité zkratky: *Konc.* - koncentrace

Tabulka 20 **Výsledky Softasept® N**

Dezinfekce Softasept® N je účinná vůči kmenům *P. aeruginosa* CCM a *K. pneumoniae*; ke kmenům *P. aeruginosa* MR a *B. cepacia* MR je účinná pouze v neředěné koncentraci, při ředění 1:1 pouze po delší době expozice. Ke kmenu *A. baumannii* MR je neúčinná

Kmen	Konc.	čas (min)	log Redukce	Kmen	Konc.	čas (min)	log Redukce	
Pseudomonas aeruginosa CCM 7930	1	0,5	>5,17	Pseudomonas aeruginosa MR	1	0,5	5,1	
		1	>5,17			1		5,24
		2	>5,17			2		5,4
		5	>5,17			5		>5,40
	1:1	0,5	>5,17		1:1	0,5		4,89
		1	>5,17			1		4,97
		2	>5,17			2		4,99
		5	>5,17			5		5,02
	1:5	0,5	3,8		1:5	0,5		4,14
		1	3,97			1		4,51
		2	>5,17			2		4,89
		5	>5,17			5		4,97
Klebsiella pneumoniae ESBL+	1	0,5	>5,39	Acinetobacter baumannii MR	1	0,5	4,76	
		1	>5,39			1		4,81
		2	>5,39			2		4,9
		5	>5,39			5		5,1
	1:1	0,5	>5,39		1:1	0,5		4,57
		1	>5,39			1		4,65
		2	>5,39			2		4,74
		5	>5,39			5		4,81
	1:5	0,5	<4,02		1:5	0,5		<3,98
		1	<4,02			1		<3,98
		2	5,19			2		<3,98
		5	>5,39			5		<3,98
Burkholderia cepacia group MR	1	0,5	5,03					
		1	5,07					
		2	5,04					
		5	>5,38					
	1:1	0,5	4,85					
		1	5,01					
		2	5,05					
		5	5,13					
	1:5	0,5	<4,01					
		1	<4,01					
		2	<4,01					
		5	4,06					

Použité zkratky: *Konc.* - koncentrace

Tabulka 21 **Výsledky Septoderm**

Dezinfekce Septoderm je účinná vůči kmenům *P. aeruginosa* CCM a *K. pneumoniae*; ke kmenům *P. aeruginosa* MR a *B. cepacia* MR je účinná pouze v neředěné koncentraci, při ředění 1:1 pouze po delší době expozice. Ke kmenu *A. baumannii* MR je neúčinná

Kmen	Konc.	čas (min)	log Redukce	Kmen	Konc.	čas (min)	log Redukce
Pseudomonas aeruginosa CCM 7930	1	0,5	>5,17	Pseudomonas aeruginosa MR	1	0,5	5,09
		1	>5,17			1	5,19
		2	>5,17			2	5,31
		5	>5,17			5	5,1
	1:1	0,5	>5,17		1:1	0,5	4,82
		1	>5,17			1	4,86
		2	>5,17			2	5,01
		5	>5,17			5	5,24
	1:5	0,5	5,09		1:5	0,5	4,5
		1	>5,17			1	4,64
		2	>5,17			2	4,85
		5	>5,17			5	4,86
Klebsiella pneumoniae ESBL+	1	0,5	>5,39	Acinetobacter baumannii MR	1	0,5	4,78
		1	>5,39			1	4,92
		2	>5,39			2	5
		5	>5,39			5	5,12
	1:1	0,5	>5,39		1:1	0,5	4,5
		1	>5,39			1	4,54
		2	>5,39			2	4,72
		5	>5,39			5	4,78
	1:5	0,5	>5,39		1:5	0,5	4,34
		1	>5,39			1	4,46
		2	>5,39			2	4,5
		5	>5,39			5	4,62
Burkholderia cepacia group MR	1	0,5	5,24				
		1	>5,38				
		2	>5,38				
		5	>5,38				
	1:1	0,5	4,92				
		1	4,93				
		2	5,07				
		5	5,27				
	1:5	0,5	4,72				
		1	4,78				
		2	4,9				
		5	5,01				

Použité zkratky: *Konc.* - koncentrace

12 Diskuze

Multirezistence je fenomén, který se začal vyvíjet už v 1. polovině 20. století, kdy bylo objeveno první ATB – penicilin (1928, A. Fleming). Od té doby bylo vyvinuto a do praxe zavedeno velké množství antibiotických přípravků. Jelikož bakterie, jako všechny ostatní organismy, podléhají selekčnímu výběru a na účinek některých ATB se stávají necitlivé, je potřeba vyvíjet stále nové struktury ATB (3. a 4. generace ATB).

Dříve se ATB používala v různých odvětvích, kde měla řadu výhod – zdravotnictví (nejen léčba, ale i profylaxe a prevence), potravinářství, chovatelství (v malém množství pro podporu růstu, přísady do krmných směsí), pěstitelství (ochrana rostlin), kosmetický průmysl (krémy, zubní pasty, ...) apod. Od řady postupů se v posledních 20 - 30 letech začíná upouštět, právě díky zjištění, že dochází ke vzniku masivních rezistencí u některých kmenů (Levy, 2007).

Multirezistentní kmeny způsobují ve zdravotnických zařízeních nozokomiální nákazy. Nejčastěji se jedná o infekce, které postihují imunokompromitované pacienty – nejčastěji jde o osoby hospitalizované na JIP a připojené na umělou ventilaci. V případě vzniku infekce je nutné zamezit šíření těchto kmenů mezi jednotlivými pacienty, proto se dodržuje řada opatření. Kromě izolace nakažených pacientů, je nutný úklid, sterilizace pomůcek, použití dezinfekcí, jak pro dezinfekci rukou personálu, tak k omytí ploch, nábytku, pomůcek. Důležité je střídání dezinfekčních prostředků (Kolář, 2000).

V této diplomové práci jsme se zaměřily na testování dezinfekcí, které se používají v provozu Fakultní nemocnice v Hradci Králové – konkrétně čtyři vzorky byly z Ústavu klinické mikrobiologie (byly vybrány na základě Dezinfekčního řádu, viz **Příloha 1**), a dva z IV. interní hematologické kliniky (Dezinfekční řád viz **Příloha 2**). Dezinfekce byly testovány podle modifikované **Evropské normy EN 1040**. Cílem bylo zjistit, jestli používané koncentrace odpovídají koncentraci baktericidní.

V normě jsou předepsány dva referenční kmeny – pro grampozitivní bakterie je to *S. aureus* a pro gramnegativní *P. aeruginosa*. Ostatní kmeny byly možností volby. Při testování účinnosti dezinfekcí se klasicky používají jen referenční kmeny, multirezistentní kmeny se nevyužívají. Proto jsme se v práci zaměřily právě na ně. Na experiment byly využity pouze gramnegativní MR kmeny, jelikož se v posledních letech stále více podílejí na vzniku NN:

P. aeruginosa s multirezistencí – citlivá ke kolistinu, která byla získána z prostředí při pravidelných kontrolách nemocničního prostředí (stěry z povrchů na odděleních – postel, nábytek, police, přístroje, počítače, klávesnice apod.). Kontroly bývají

prováděny pravidelně, jak na oddělení JIP, tak na odděleních standardních. Z toho důvodu se dá kmen považovat za velmi odolný vůči okolním podmínkám.

K. pneumoniae s produkcí širokospektrých β -laktamas (ESBL). Jedná se o klinický izolát získaný z rány pacienta hospitalizovaného na I. interní klinice FN HK. Podle *Přehledu rezistence bakterií na ATB ve Fakultní nemocnici Hradce Králové* z roku 2013 (zpracovává data z let 2009 – 2013) je *K. pneumoniae* dlouhodobě jedním z nejzávažnějších nozokomiálních patogenů, 40,9 % izolátů *K. pneumoniae* tvoří kmeny produkující ESBL (Paterová, 2013).

A. baumannii s multirezistencí (rezistentní i ke karbapenemům) je taktéž klinickým izolátem získaným z rány pacienta hospitalizovaného na chirurgické klinice FN HK. Kmeny *A. baumannii* patří mezi nejodolnější nemocniční patogeny (spolu s enterobaktery), nejen proti dezinfekcím, ale i na vyschnutí. Ve FN HK bývá největší množství izolátů získáno z ran (47,43 %), velké zastoupení mívají také vzorky z dolních cest dýchacích (25 %) a moče (24,22%) (Paterová, 2013). Ve FN se v praxi běžně vyskytují kmeny citlivé ke karbapenemům, multirezistentní *A. baumannii* se vyskytuje vzácně, většinou jde o importované kmeny ze zahraničí nebo jiného zdravotnického zařízení. Pro svoji odolnost jsou rychle a snadno přenositelné mezi pacienty a jejich výskyt bývá často epidemický (tzv. *outbreak*). Tyto situace vyžadují důrazná a rychlá protiepidemická opatření, potlačení *outbreaku* bývá často ekonomicky i časově náročné. Zpracováváný kmen byl izolován z právě probíhajícího *outbreaku* výskytu multirezistentního *A. baumannii* na JIP chirurgického oddělení.

B. cepacia byla izolována ze sputa pacienta hospitalizovaného na plicní klinice FN HK. Tato bakterie je potenciálním patogenem pro všechny pacienty, zvláště však pro pacienty trpící cystickou fibrózou. *B. cepacia* v dýchacích cestách těchto pacientů výrazně zhoršuje průběh a projevy plicního onemocnění a současně tito pacienti nejsou při kolonizaci *B. cepacia* zařazováni do programu transplantace plic. Nozokomiální přenos má tedy pro tyto pacienty dalekosáhlé důsledky. Protože ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové funguje jedno z center pro pacienty s CF, byla *B. cepacia* zařazena i do našeho testování.

V normě EN 1040 v příloze B je seznam možných neutralizačních činidel, které je možné v experimentu použít. Na základě dostupných reagentů v laboratoři byl vybrán *Sørensenův pufr* (0,133 M, pH 7,2), *fosfátový pufr* (pH 7,2) a 5 % roztok z *čerstvých žloutků*. Při testování účinnosti neutralizátoru (**10.2.3**) ani jeden z pufrů dezinfekci neneutralizoval, použit byl tedy roztok ze žloutku.

V metodice byla požadována kultivační půda – *trypton-sojový agar (TSA)*, který jsme nahradily krevním agarem, protože je lépe dostupný v rutinní mikrobiologické

laboratoři. TSA je také půda chudá na živiny, to by mohl být problém pro kmen *B. cepacia*, který je náročnější na kultivační podmínky, nejen že vyžaduje delší dobu kultivace, ale také často přidavek krve nebo krevních derivátů v kultivačních půdách.

Po získání všech výsledků jsme zjistily, že dezinfekce používané v laboratořích ÚKM (*Manusept® Basic*, *Sterillium® Med*, *Cleanisept®* a *Descosept AF*) jsou dostatečně účinné proti všem testovaným multirezistentním kmenům.

Manusept® Basic je ethanolová dezinfekce používána v praxi k hygienické a chirurgické dezinfekci rukou. Předepsaná expoziční doba je 30 s pro hygienickou a 3 min pro chirurgickou dezinfekci rukou. V experimentu byla dezinfekce účinná v ředění 1 i 1:1 v časech 30 s, 1 min, 2 min a 5 min, což odpovídá deklaraci výrobce.

Sterillium® Med je ethanolová dezinfekce s přidavkem glycerolu, která se používá pro hygienickou a chirurgickou dezinfekci rukou. Předepsaná expoziční doba je 30 s pro hygienickou a 1, 5 min pro chirurgickou dezinfekci rukou. Při experimentu byla tato dezinfekce účinná při ředění 1 a 1:1 v časech 30 s, 1 min, 2 min a 5 min, což odpovídá informacím v příbalovém letáku od výrobce.

Cleanisept® je kombinovaný dezinfekční prostředek, základ tvoří kvartérní amoniové sloučeniny (KAS) a povrchově aktivní látky, proto má přípravek dezinfekční a mycí účinky. Používá se jako ředěný k dezinfekci a mytí diagnostických pomůcek a povrchů (nábytek, podlaha apod.). Předepsaná expoziční doba pro 1 % roztok, který jsme v experimentu použili, je 1 h. Při testování byla dezinfekce účinná při ředění 1 (1 %) a 1:1 v časech 30 s, 1 min, 2 min a 5 min pro všechny MR kmeny. Dále byla účinná i při ředění 1:5 v časech 2 min a 5 min, což výrazně předčí garance výrobce.

Descosept AF je ethanolový přípravek s malou příměsí KAS. Používá se k dezinfekci malých ploch, povrchů a diagnostických pomůcek. Předepsaný fungicidní a baktericidní účinek je po 1 min expozice, pro viry je to 1 – 5 min (podle druhu viru). Při experimentu byla dezinfekce účinná při ředění 1 a 1:1 v časech 30 s, 1 min, 2 min a 5 min proti všem kmenům. K *B. cepacia* byla účinná i při ředění 1:5. Vše odpovídá garancím výrobce.

Dezinfekce získané z hematologické kliniky (*Softasept® N* a *Septoderm*) vykazovaly 100 % účinnost v neředěné formě, a to pouze k referenčnímu kmenu *P. aeruginosa*, MR kmenům *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* a *B. cepacia*. Ke kmenu *A. baumannii* MR dezinfekce nebyla dle kritérií normy účinná.

Softasept® N je ethanolový přípravek používaný k dezinfekci kůže před odběrem krve, injekcí, punkcemi apod. Předepsaná expoziční doba je 15 s před injekcí a 1 min před punkcí nebo operací. Při experimentu byla dezinfekce účinná při ředění 1 (100 %) v časech 30 s, 1 min, 2 min a 5 min ke všem kmenům kromě *A. baumannii*. Při ředění

1:1 byla účinná pouze k referenčnímu kmenu, *K. pneumoniae* a *B. cepacia*. K MR kmenu *A. baumannii* byl přípravek účinný pouze v ředění 1 po 5 minutách expozice, což neodpovídá expoziční době deklarované výrobcem.

Septoderm je ethanolová dezinfekce používaná k hygienické a chirurgické dezinfekci rukou, dále k dezinfekci kůže před vpichem, operací apod. Doporučená doba expozice je 30 s pro hygienickou a 3 min pro chirurgickou dezinfekci rukou. Při testování byl přípravek 100 % účinný k referenčnímu kmenu *P. aeruginosa* a MR *K. pneumoniae* ve všech ředěních; ke kmenům *B. cepacia* a MR *P. aeruginosa* pouze při ředění 1 (100 %) ve všech časech a při ředění 1:1 v časech 2 a 5 min. Ke kmenu *A. baumannii* byla dezinfekce účinná pouze při expozici 2 a 5 min neředěném stavu.

Vzhledem k výsledkům je zřejmé, že při použití dezinfekcí *Softasept*[®] a *Septoderm*[®] je nutná delší expoziční doba. Tedy používání 15-ti nebo 30-ti sekundové expozice při hygienické dezinfekci rukou nejsou zcela účinná v situacích, kdy je možno předpokládat výskyt MR *A. baumannii*. Tato situace může nastat při ošetřování nebo provádění výkonu u pacientů při známé infekci/kolonizaci MR *A. baumannii*, dále pacientů, kteří byli v kontaktu s pacienty s infekcí/kolonizací MR *A. baumannii*. Používání *Septodermu* a *Softaseptu* je proto při ošetřování těchto pacientů nevhodné. Jednou z možností by bylo prodloužit expoziční dobu běžné hygienické dezinfekce rukou a kůže na 2-3 minuty. To by ale při běžné ošetrovatelské praxi vedlo ke zbytečnému prodloužení a hrozila by špatná compliance zdravotnického personálu. Také odhad/měření doby expozice při běžném ošetřování pacienta je problematické. Při chirurgickém mytí rukou (doba expozice 3 - 5 minut) je možno oba přípravky (*Septoderm* i *Softasept*) používat bez obav.

Antibiotická rezistence (i multirezistence) není problémem jedné země, ale jedná se o problém celosvětový. Příčinou jejího vzestupu je časté nadužívání a nesprávné používání ATB v humánní medicíně. K šíření rezistencí přispívají i nedostatky v oblasti prevence a kontroly infekcí ve zdravotnických zařízeních i v běžné populaci. Šíření ATB rezistence výrazně ovlivňuje morbiditu, mortalitu, délku hospitalizace a náklady na zdravotní péči. Od roku 2009 platí v ČR *Národní antibiotický program*, který má za úkol dohlížet na bezpečnou, účinnou a nákladově efektivní antibiotickou léčbu infekčních onemocnění. Hlavní činnosti Národního antibiotického programu je formulace a průběžná aktualizace zásad národní antibiotické politiky, sledování a analýza spotřeby a požívání ATB nebo realizace opatření zaměřených na prevenci a kontrolu infekcí (Šturma, 2010).

Výrazné riziko vzniku rezistencí hrozí zejména v oblastech rozvojového světa. Např. v mnoha zemích Latinské Ameriky jsou ATB dostupná v lékárnách (i mimo ně)

bez předpisu lékaře. Dokonce se na ně vztahují různé akce a výprodeje. Tuto situaci by mohla změnit pouze změna farmaceutického byznysu v těchto oblastech (Levy, 2007).

13 Závěr

Nozokomiální infekce a problém výskytu a šíření multirezistence jsou v dnešní době hodně sledovanými a diskutovanými tématy jak v rámci jednotlivých zdravotnických zařízeních, tak na úrovni státu či celého světa. Je nezbytné tyto problémy dobře poznat, specifikovat zákonitosti a důvody. Zcela esenciální pro pacienta a potažmo tedy pro zdravotnická zařízení je však nozokomiálním nákazám a zvláště těm způsobeným multirezistentními kmeny předcházet. V této diplomové práci jsme si daly za cíl zjistit, jak jsou dezinfekce používané v běžném provozu laboratoří a zdravotnických zařízení citlivé k multirezistentním kmenům gramnegativních bakterií, a tím přispět ke zvýšení bezpečí pacienta při pobytu v nemocnici.

14 Citovaná literatura

- Baltch, Aldona L. a Smith, Raymond P. 1994.** *Pseudomonas aeruginosa: Infections and treatment.* New York : Marcel Dekker, 1994. stránky 612-617. ISBN 0-8247-9210-6.
- Bednář, Marek a kol. 1996.** *Lékařská mikrobiologie.* Praha : Triton, 1996. str.558. ISBN 80-2380-297-6.
- Bennet, P.M. 2008.** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology.* 153(1), str.347-357; online ISSN 1476-5381, 2008.
- Blažej, Anton. 1977.** *Tenzidy.* Bratislava : Alfa, 1977. ISBN: 63-173-77.
- BODE.cz.** Sterillium. *BODE.cz.* [Online] [Citace: 23. březen 2014.] <http://www.bode.cz/produkty-dezinfekce-hygiena/ruce/sterillium/index.php>.
- Cabrera, Crisitna Eugenia, Gómez, Rommel Fabián a Zúñega, Andres Edmundo. 2007.** La resistencia de bacterias a antibioticos, antisepticos y desinfectantes una manifestacion de los mecanismos de supervivencia y adaptacion. *Colombia Médica.* 2007, 38(2), str. 149-158.
- CDC. 2009.** Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008. *Centers for Disease Control and Prevention.* [Online] 29. prosinec 2009. [Citace: 21. březen 2014.] http://www.cdc.gov/hicpac/disinfection_sterilization/6_0disinfection.html.
- Coenye, Tom, a další. 2001.** Taxonomy and Identification of the Burkholderia cepacia Complex. *Journal of Clinical Microbiology.* 2001, 39(10), ISSN 1098-660X, stránky 3427-3436 .
- Daza Peréz, R.M. 1998.** Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (España).* [Online] 1998. [Citace: 22. leden 2014.] http://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/infMedic/porVolumen/home.htm.
- del Mar Casal, María, Causse, Manuel a Rodríguez-López, Fernando. 2012.** Resistencia antimicrobiana en aislados clinicos de Pseudomonas aeruginosa. *Revista de la Sociedad Española de Quimioterapia.* 2012, 25(1), ISSN 0214-3429, str. <http://www.seq.es/index.php>.
- Dijkshoorn, L., a další. 1996.** Comparison of outbreak and nonoutbreak Acinetobacter baumannii strains by genotypic and phenotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology.* 1996, 34(6), ISSN 1098-660X, stránky 1519-1525 .
- EUCAST. 2013.** Antimicrobial susceptibility testing of Burkholderia cepacia komplex (BCC). *EUCAST - European Committee on Antimicrobial susceptibility Testing.* [Online] 19. červenec 2013. [Citace: 19. březen 2014.] http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/BCC_susceptibility_testing_130719.pdf.

- Gómez Álvarez, Carlos Andrés, Leal Castro, Aura Lucía a kol. 2005.** Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: Entendiendo a un peligroso enemigo. *Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*. 2005, 53(1); ISSN 0120-0011.
- Hedlová, Dana. 2010.** Jak správně provádět hygienu rukou? *Interní medicína pro praxi*. 2010, 12(6), stránky 334-335, ISSN - 1803-5256.
- Heinemann, Jack A. 1999.** How antibiotics cause antibiotic resistance. *Drug Discovery Today*. 4(2), str.72-79, 1999.
- Hrabák, Jaroslav a Zemličková, Helena. 2010.** Výskyt multirezistentních gramnegativních bakterií v českých nemocnicích - upozornění na problém šíření bakterií produkujících transferabilní karbapenemázy. *Společnost nemocniční epidemiologie a hygieny SNEH*. [Online] 9. říjen 2010. [Citace: 27. duben 2014.] http://www.sneh.cz/_soubory/_clanky/12.pdf.
- Jedličková, Zdena. 1981.** *Pseudomonas aeruginosa*. Praha : Academia, 1981. stránky 12-18; 91-101. ISBN 509-21-827.
- Julák, Jaroslav. 2012.** *Klinicky významné bakterie*. Praha : Triton, 2012. str. 65. ISBN 978-80-7387-588-6.
- **2006.** *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha : Karolinum, 2006. stránky 118-121. ISBN 80-246-1270-4.
- Kolář, Milan. 2000.** *Antibiotická léčba nozokomiálních infekcí*. Praha : Triton, 2000. stránky 157-169. ISBN 80-7254-151-X.
- Koleman, Elmer a Stephen, Allen. 2008.** *Diagnostico Microbiologico: Texto Y Atlas En Color*. Madrid : Editorial Medica Panamericana, 2008. stránky 300-310. ISBN 978-9500608954.
- Levy, Stuart B. 2007.** *Antibiotický paradox*. Praha : Academia, 2007. ISBN 978-80-200-1485-6.
- Maďar, Rastislav a kol. 2006.** *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*. Praha : Grada, 2006. stránky 15-25. ISBN 80-247-1673-9.
- Manchanda, Vikas a Sanchaita, Sinha. 2010.** Multidrug resistant *Acinetobacter*. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2010, 2(3), ISSN 0974-8245, stránky 291-304.
- Marolda, Cristina L., a další. 1999.** Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. *Microbiology*. 1999, 145(7), ISSN 1465-2080, stránky 1509-1517.
- Melicharčíková, Věra. 2010.** Možnosti kontrol dezinfekce a sterilizace. *Sestra*. 4, 2010.
- **1998.** *Sterilizace a dezinfekce ve zdravotnictví*. Praha : Grada, 1998. ISBN 80-716-944-28.
- Míčková, Eva. 2009.** *Celonemocniční hygienicko-protiepidemiologický řád FN Hradec Králové*. 2009.
- MZČR. 306/2012 Sb. Ministerstvo zdravotnictví ČR.** [Online] [Citace: 20. březen 2014.] http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/opatreni-proti-infekcnim-nemocem_3548_1789_11.html.

- Nemec, Alexandr. 2008.** Multirezistentní *Acinetobacter baumannii*. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2008, 14(5), ISSN 1211-264X.
- Nemec, Alexandr, Křížová, Lenka a Maixnerová, Martina. 2011.** Multirezistentní *Acinetobacter baumannii* nesoucí geny pro karbapenemázy NDM-1 a OXA-23 importovaný do České republiky. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie*. 2011, 20(8), ISSN 1211-7358.
- Paterová, Pavla. 2013.** *Přehled rezistencí bakterií na antibiotika - Fakultní nemocnice Hradec Králové*. 2013.
- Paterson, David L. a Bonomo, Robert A. 2005.** Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005, 18(4), ISSN 1098-6618.
- Paterson, David L., Ko, Wen-Chien a kol. 2004.** Antibiotic Therapy for *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Implications of Production of Extended-Spectrum β -Lactamases. *Clinical Infectious Diseases*. 2004, 39(1), str. 31-37, ISSN 1537-6591.
- Poole, Keith. 2000.** Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000, 44(9), ISSN 0066-4804.
- Saene, H. K. F., a další. 2012.** *Infection Control in the Intensive Care Unit 3rd edition*. New York : Springer, 2012. str. 635. ISBN 978-88-470-1601-9.
- Sas, Igor. 2010.** Nozokomiální infekce a infekce multirezistentními organismy v podmínkách intenzivní péče. *Postgraduální medicína*. [Online] 05. listopad 2010. [Citace: 11. únor 2014.] <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/nozokomialni-infekce-a-infekce-multirezistentnimi-organismy-v-podminkach-intenzivni-pece-455567>.
- Schindler, Jiří. 2009.** *MIKROBIOLOGIE pro studenty zdravotnických oborů*. Praha : Grada, 2009. str. 61. ISBN 978-80-247-3170-4.
- Simon, Claus a Stille, Wolfgang. 1998.** *Antibiotika v současné lékařské praxi*. Praha : Grada, 1998. stránky 23-27. ISBN 80-7169-268-9.
- Spížek, Jaroslav. 1999.** Rezistence na antibiotika. *Vesmír*. 1999, 78(1), ISSN 1214-4029, str. 27.
- Sussmann P., Otto Alberto, Mattos, Lorenzo a Restrepo, Andrés.** Resistencia bacteriana. *Pontificia Universidad Javeriana Bogotá - Facultad de Medicina*. [Online] [Citace: 22. leden 2014.] <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>.
- Šrámová, Helena. 1995.** *Nozokomiální nákazy*. Praha : Maxdorf, 1995. stránky 29-35. ISBN 80-85912-00-7.
- . 2001. *Nozokomiální nákazy II*. Praha : Maxdorf, 2001. ISBN 80-85912-25-2.
- Šturma, Jan. 2010.** Národní antibiotický program - ustanovení a struktura. *Společnost pro lékařskou mikrobiologii*. [Online] 28. duben 2010. [Citace: 26. duben 2014.] http://www.splm.cz/dokumenty/PS_ATB.pdf.
- Votava, Miroslav. 2005.** *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno : Neptun, 2005. stránky 240-241. ISBN 80-86850-00-5.

—. 2006. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno : Neptun, 2006. str. 104. ISBN 80-902896-6-5.

WHO. 2011. Souhrn: Smernice SZO - Hygiena rukou ve zdravotnictví. *Ministerstvo zdravotnictví České republiky*. [Online] 2011. [Citace: 24. duben 2014.]

http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0C0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.mzcr.cz%2FKvalitaABezpeci%2FSoubor.ashx%3FsouborID%3D17480%26typ%3Dapplication%2Fpdf%26navez%3DHygiena_rukou_ve_zdravotnictv%25C3%25AD_Prvn%25C.

Zálabská, Eva, Bareková, Lucie a kol. 2012. Antibiotická rezistence a zásady správné indikace antibiotik v terénní praxi. *MeDiLa laboratoře s.r.o.* [Online] květen 2012. [Citace: 11. únor 2014.] http://www.medila.cz/website/rozcestnik/lekar/bulletin/bulletin1_2012/.

Zeman, Miroslav a Krška, Zdeněk. 2011. *Chirurgická propedeutika*. Praha : Grada, 2011. str. 31. ISBN 978-80-247-3770-6.

15 Abecední seznam použitých zkratk

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Ag	antigen
Ag	stříbro
AMC	amoxycilin-klavulonát
AMI	amikacin
AMP	ampicilin
ATB	antibiotikum
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCC	komplex <i>Burkholderia cepacia</i>
C	citlivý
CDC	Centrum for Disease Control and Prevention
CCM	Česká sbírka mikroorganismů (Brno)
CF	cystická fibróza
CFU	colony-forming unit; kolonie tvořící jednotky
CGD	chronická granulomatózní choroba
CIP	ciprofloxacin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COL	kolistin
CTX	cefotaxim
CTZ	ceftazidim
Cu	měď
CXM	cefuroxim
CZL	cefazolin
ČSN	Česká technická norma
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EN	Evropská norma
ESBL	extended-spectrum betalactamase; širokospektrá betalaktamasa
ESBL+	širokospektré β -laktamasy
ETP	ertapenem
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FEP	cefepim
FN	Fakultní nemocnice
FzR	fyziologický roztok

GEN	gentamycin
GIT	gastro-intestinální trakt
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
Hg	rtuť
HK	Hradec Králové
I	intermediálně citlivý
I ₂	molekulární jod
IPM	imipenem
JCI	Joint Commission International
JIP	jednotka intenzivní péče
K Ag	kapsulární antigen
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KA	krevní agar
KAS	kvartérní amoniové sloučeniny
KI	jodid draselný
KMnO ₄	manganistan draselný
KOH	hydroxid draselný
konc.	koncentrace
LPS	lipopolysacharid
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MBL	metalo-β-laktamasa
MER	meropenem
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MR	multirezistence/multirezistentní
MRSA	metacilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MZČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
NaOH	hydroxid sodný
NN	nozokomiální nákaza
O Ag	tělový antigen
OOVZ	orgány ochrany veřejného zdraví
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	penicillin binding proteins; penicilin vázající proteiny
PTZ	piperacilin-tazobaktam
R	rezistentní
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

SAM	ampicilin-sulbaktam
Sn	cín
SXT	trimethoprim-sulfonamid
SZO	Světová zdravotnická organizace
TE	tetracyklin
TGC	tigecyklin
TSA	trypton-sojový agar
ÚKM	Ústav klinické mikrobiologie
VRE	vankomycin rezistentní <i>Enterococcus</i>
VRSA	vankomycin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace (SZO)

16 Seznam použitých tabulek

Tabulka 1 Nejčastější infekce u nozokomiálních nákaz a jejich procentuální zastoupení	18
Tabulka 2 Přehled potenciálně patogenních mikroorganismů (PPM)	19
Tabulka 3 Přehled mechanismů rezistence u rodu <i>Acinetobacter</i>	32
Tabulka 4 Fyzikální postupy sterilizace a dezinfekce	36
Tabulka 5 Specifikace kmenů	43
Tabulka 6 Citlivost kmenů na ATB	44
Tabulka 7 Soupravy použité pro stanovení citlivosti	44
Tabulka 8 Převod jednotek mezi 10^8 a zákalovými jednotkami dle McFarlanda (v 1 ml)	49
Tabulka 9 Počet buněk spočítaných na 1 ml v různých testovaných směsích	53
Tabulka 10 Přehled množství kolonií v 1 ml	55
Tabulka 11 Výsledky validace <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 7930	55
Tabulka 12 Výsledky validace <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL+	56
Tabulka 13 Výsledky validace <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	56
Tabulka 14 Výsledky validace <i>Acinetobacter baumannii</i> MR	56
Tabulka 15 Výsledky validace <i>Burkholderia cepacia</i> MR	56
Tabulka 16 Výsledky Manusept® Basic	57
Tabulka 17 Výsledky Sterillium® Med	58
Tabulka 18 Výsledky Cleanisept®	59
Tabulka 19 Výsledky Descosept AF	60
Tabulka 20 Výsledky Softasept® N	61
Tabulka 21 Výsledky Septoderm	62

17 Seznam použitých obrázků

Obrázek 1 Postup při mytí rukou	20
Obrázek 2 Postup pro dezinfekci rukou.....	21
Obrázek 3 5 základních situací pro hygienu rukou	21
Obrázek 4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – mikroskopický preparát barvený dle Grama	24
Obrázek 5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na krevním agaru	24
Obrázek 6 Schéma povrchu <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
Obrázek 7 Procenta zastoupení rezistentního kmene <i>P. aeruginosa</i> k ceftazidimu v rámci Evropy, 2012	27
Obrázek 8 <i>Klebsiella pneumoniae</i> na krevním agaru, bíle pigmentované kolonie, slizovité.....	28
Obrázek 9 <i>Klebsiella pneumoniae</i> na Endově půdě	29
Obrázek 10 Procenta zastoupení multirezistentní <i>K. pneumoniae</i> v rámci Evropy, 2012	30
Obrázek 11 <i>Acinetobacter baumannii</i> na krevním agaru	31
Obrázek 12 Výskyt <i>A. baumannii</i> rezistentního ke karbapenémům v Evropě, založeno na hodnocení expertů dané země, 2013.....	33
Obrázek 13 Bakterie <i>Burkholderia cepacia</i> na snímku ze skenovacího elektronového mikroskopu, zvětšeno 117 000x.....	34
Obrázek 14 <i>Burkholderia cepacia</i> na krevním agaru	34

18 Přílohy

18.1 Příloha 1

DEZINFEKČNÍ PROGRAM ÚKM FN HK							
OBLAST POUŽITÍ		PROSTŘEDEK	ÚČINNÉ LÁTKY	KONCENTRACE	EXPOZICE	ÚČINNOST	
RUCE	Hygienická dezinfekce rukou	Manusept basic	alkohol	koncentrát 3 ml	30 s	A, (B), T, M, V	
		Sterillium med	alkohol	koncentrát 3 ml	30 s	A, B, T, M, V	
NÁSTROJE	Dekontaminace laboratorních pomůcek, potřísněného prádla biologickým materiálem	Presept tbl.	dichlorisokyanuran sodný	1 tbl. / 1l vody	15 s	A, B, T, V	
		Presept granulát	dichlorisokyanuran sodný	zasypat kontaminované místo	2 min	A, B, V	
PLOCHY	Velké plochy	Incidin rapid	KAS + glutaraldehyd	0,50 %	30 min	A, (B), T, M, V	
		Oxiper	Peroxid vodíku	0,25 %	30 min	A, (B), C, V	
	Malé plochy, povrchy a ZP	Cleanisept Wipes	Didecyldimethylammonium-chlorid benzylalkyldimethylammonium-chlorid	1 %	15 min	A, B, MRSA	
		Optisal N	N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamine	0,50 %	60 min	A, B, V, T, MRSA	
		Descosept AF	ethanol didecyldimethylammonium-chlorid	koncentrát	1 min	A, B, T, V	
A - baktericidní	T - tuberkulocidní	Tabulka koncentrace pracovních roztoků					
B - plně virucidní	V - fungicidní		0,50 %	1 %	1,50 %		
(B) virucidní		1l	5 ml	10 ml	15 ml		
M - mykobaktericidní		2l	10 ml	20 ml	30 ml		
		3l	15 ml	30 ml	45 ml		
		5l	25 ml	50 ml	75 ml		
		8l	40 ml	80 ml	120 ml		
		10l	50 ml	100 ml	150 ml		
Dezinfekční prostředky jsou střídány po 1 měsíci. Odmývání dezinfekčního prostředku se provádí 1 týdně.							

18.2 Příloha 2

DEZINFEKČNÍ PROGRAM							
IV. INTERNÍ HEMATOLOGICKÁ KLINIKA - intenzivní péče (OHIP, TRANSPL.)							
oblast požití		přípravek	účinná látka	konc.	expozice	účinnost	poznámky
ruce	mytí rukou	tekutá mýdla	mycí emulze				
	hygienická dezinfekce rukou	Manusept Basic	alkohol	3 ml	30 s	A(B)TMV	vtírat do suchých rukou
Sterillium Med		alkohol	3 ml	30 s	ABTMV		
pokožka sliznice	dezinfekce pokožky	Softasept N barevný	alkohol	konc.	1 min	ABTMV MRSA	pokožku důkladně smočít, nechat zaschnout. Na operační pole používat barevný prostředek
		Septoderm	alkohol + KAS	konc.	30 s	ABTMV MRSA	
		Alkohol Pads	alkohol	70%	15 s	ABTMV	
	na sliznice	Skinsept Mucosa	chlorhexidin glukonát	konc.	60 s	ABV MRSA	sliznice dezinfikuje důkladným otřením, nefedí se
nástroje	instrumentárium	Stabimed lichý měsíc	amin	0,50%	30 min	A(B)T	nástroj ponořit do roztoku po dobu expozice
		Helipur H plus N sudý měsíc	aldehyd + alkohol	1%	30 min	A(B)TMV	
PLOCHY	malé plochy a zdrav. Pomůcky	Oxiper lichý měsíc	H2O2 + KAS	0,25%	30-60 min	ABCTMV	vytřít, ponořit či omýt roztokem a nechat zaschnout
		Hexaquart forte sudý měsíc	KAS	1,00%	30 min	A(B)CV	
		Hexaquart forte sudý měsíc (wipes)	KAS	1%	30 min	A(B)V	aplikační kbelík naplnit rolí jednorázových utěrek a zalít 3l dezinfekce, spotřeba do 28 dní
		Hexaquart plus lichý měsíc (wipes)	amin + KAS	1%	30 min	A(B)V MRSA	
	malé plochy	Desprej	alkohol	konc.	1 min	ABV MRSA	postřik
		Meliseptol foam	pěna	konc.	1 min	ABMTV MRSA	postřik, vhodné na citlivé povrchy
	velké plochy	Hexaquart forte sudý měsíc	KAS	1%	30 min	A(B)V	vytřít či omýt roztokem a nechat zaschnout
		Oxiper lichý měsíc	H2O2 + KAS	0,25%	30-60 min	ABCV	
		ProCura PE	k. peroctová	0,30%	30 min	ABCTMV	v případě osídlení pac.
		ProCura CL	chlor	0,25%	30 min	ABTMV	v případě osídlení pac.

A - baktericidní, B - virucidní, C - sporicidní, T - tuberculocidní, M - mykobaktericidní, V - fungicidní

Tento dezinfekční řád vychází z celonemocničního dezinfekčního řádu (ZS10/PPZ 9)

Za dodržování a kontrolu zodpovídá: staniční sestra oddělení, vedoucí oddělení úklidu