NÁRODNÍ STANDARDNÍ VYŠETŘOVACÍ POSTUP

NSVP_2_2013

-

Základní mikrobiologické vyšetření materiálů z dolních cest dýchacích mikroskopicky a semikvantitativní kultivační metodou

SEM ČLS JEP A SLM ČLS JEP

Vypracoval	Kontroloval	Schválil
MUDr. Josef Scharfen		

Rozdělovník

Výtisk č.	Umístění	Odpovědná osoba	Podpis
1	Tištěná forma – správce dokumentů WEB SLM	Správce dokumentů	
2	Elektronická forma – Archív dokumentů WEB SLM	Správce dokumentů	

Revize

Číslo revize	Datum revize	Odpovědná osoba	Podpis
1			
2			
3			
4			
5			

Obsah

Úvod

Technické informace /omezení

1 Bezpečnost práce

1.1 Odběr vzorku

1.2 Doprava a skladování vzorku

1.3 Zpracování vzorku

2 Odběr vzorku

2.1 Optimální doba odběru

2.2 Správný typ vzorku a metoda odběru

2.3 Vhodný objem a počet vzorků

3 Doprava a skladování vzorku

3.1 Časový interval mezi odběrem a zpracováním vzorku

3.2 Zvláštní požadavky k zamezení znehodnocení vzorku

4 Zpracování vzorku

4.1 Výběr testů

4.2 Makroskopický vzhled vzorku

4.3 Mikroskopie

4.4 Kultivace a odečítání

4.5 Identifikace

4.6 Vyšetření citlivosti na antibiotika

5 Vydávání výsledku

5.1 Vzhled

5.2 Mikroskopie

5.3 Kultivace

5.4 Vyšetření citlivosti na antibiotika

6 Hlášení místním a národním orgánům veřejného zdraví

7 Materiálně technické zabezpečení

8. Systém kontroly jakosti

9. Validace a verifikace

10. Související dokumentace

11. Literatura

12. Definice, terminologie a zkratky

13. Rozdělovník

14. Související záznamy

15. Přílohy

Název: Základní mikrobiologické vyšetření bronchoalveolární laváže, sputa a přidružených vzorků mikroskopicky a semikvantitativní kultivační metodou

Úvod

Typ vzorků

Bronchoalveolární aspirát

Bronchiální seškrab

Bronchiální výplach

Vzorek odebíraný krytým kartáčovým stěrem

Vykašlané sputum

Bronchoalveolární laváž

Transthorakální aspirát

Transtracheální aspirát

Kašlací výtěrovka/plotna

Vzorek z endotracheální cévky

Ag RS virus – nazální výplach/výtěr
Ag *S. pneumoniae* – moč
Ag. *L. pneumophila* - moč

Předmět dokumentu

Tento dokument popisuje izolaci organizmů o nichž je známo, že způsobují bakteriální respirační infekce ze sputa, BALu a přidružených vzorků.

Záchyt a rozpoznání organizmů odpovědných za rozvoj pneumonie závisí na:

• Adekvátním vzorku z dolních dýchacích cest

• Zabránění kontaminace z horního respiračního traktu

• Použití mikroskopických a kultivačních metod

• Na prodělané a probíhající antimikrobiální léčbě

Rozdíl mezi tracheobronchiální kolonizací a pravou plicní infekcí lze obtížně prokázat.

Infekce dolního respiračního traktu (DCD) jsou pneumonie a bronchiolitida. Pneumonie je zánět plicního parenchymu a bronchiolitida která je zánět bronchiolů.

Méně časté infekce dolního respiračního traktu jsou plicní absces a empyém. Plicní absces je membránou ohraničené ložisko v plicní tkáni větší než 2 cm vyplněné hnisem, kde dochází k nekróze plicní tkáně v důsledku hnisavého zánětlivého procesu. a empyém je kolekce hnisu v pleurální dutině (pohrudniční výpotek).

Pneumonie

Pneumonie může být klasifikována podle toho, zda je **komunitní** pneumonie nebo **nozokomiální** (začátek je po 48 hodinách hospitalizace). Může být **primární**, která se vyskytuje u osob bez předchozích rizikových faktorů, nebo **sekundární**. Mnoho diagnóz je

sdruženo se vzestupným rizikem pneumonie. Obvyklé rizikové faktory zahrnují chronické onemocnění plic jako **chronická obstrukční pulmonální nemoc (COPD)**, cukrovka, srdeční nebo renální selhání a imunosuprese (buď získaná nebo vrozená). Snížená hladina vědomí a oslabením polykacího a kašlacího reflexu jsou rizikovými faktory pro **aspirační pneumonii**. Současná infekce respiračními viry, zvláště virem influenzy je rovněž rizikovým faktorem. U individuálního pacienta existují klinické příznaky a laboratorní průkazy, které, pokud jsou přítomny, mohou být použity ke stanovení závažnosti pneumonie, některé z nich jsou prediktivní pro zvýšené riziko smrti.

Etiologie pneumonie se liší podle toho, zda vznikla v komunitě nebo v nemocnici, a podle přítomnosti rizikových faktorů. Původcem pneumonie bývá mnoho baktérií kolonizujících horní respirační trakt. Antibiotická léčba a hospitalizace mění kolonizující flóru, zvyšuje se počet aerobních gramnegativních baktérii. Tyto faktory ovlivňují citlivost a specificitu kultivace sputa jako diagnostického vyšetření a výsledky musejí být vždy interpretovány ve světle klinických informací. Výsledky kultivace sputa jsou obvykle nespolehlivé a záchyt mnoha patogenů je nízký, i když kultivace a vyšetření citlivosti izolátů na antibiotika má nezastupitelnou hodnotu ve vzorcích sputa od pacientů se závažnou exacerbací chronické obstrukční choroby bronchopulmonální (CHOCHBP).

Komunitní pneumonie (Community Acquired Pneumonia = CAP)

Nejčastější příčinou je *Streptococcus pneumoniae,* který je odpovědný za 60 % případů komunitních pneumonií a může být rezistentní na mnoho antibiotik. V České republice je zatím výskyt pneumokoků rezistentních na penicilin velmi nízký. Postihuje pacienty bez rozdílu věku včetně takových, kteří nemají žádné rizikové faktory. Ostatní bakteriální patogeny mají tendenci způsobit pneumonii v přítomnosti specifických rizikových faktorů. Pacienti s CHOCHBP mají navíc riziko vzniku pneumonie vyvolané *Haemophilus influenzae* a *Moraxella catarrhalis,* zejména pacienti s HIV infekcí. Pneumonie vyvolána *Staphylococcus aureus* se vyskytuje buď v souvislosti se současnou infekcí virem chřipky, nebo méně často jako výsledek hematogenního šíření ze vzdáleného fokusu, CHOCHBP nebo při aspiraci. Aerobní gramnegativní tyčinky jsou vzácně příčinami komunitní pneumonie. Příležitostně způsobuje *Klebsiella pneumoniae* závažnou nekrotizující pneumonii, typickou u pacientů s anamnézou alkoholizmu a u bezdomovců (tzv. Friedländerova pneumonie).

Mycoplasma pneumoniae způsobuje do 20 % komunitních pneumonií a je na druhém místě za *Streptococcus pneumoniae.* Má tendenci se vyskytovat v epidemiích každých 4 - 5 let a postihuje mladší věkové skupiny. *Chlamydia pneumoniae* je výlučně lidský patogen, ale pneumonie způsobené *Chlamydia psittaci* a *Coxiella burnettii* se vyskytují u lidí, kteří mají výraznou expoziční anamnézu (ptáci, zvířata na farmách). Tato agens jsou odpovědná za minimum případů. *Legionella pneumophila* je vzácnou příčinou epidemií u CAP a většina případů má nedávnou cestovatelskou anamnézu (pobyty v zahraničí). Respirační viry jako RSV, virus influenzy a adenoviry mohou příležitostně způsobit primární virovou pneumonii. Další vzácné případy CAP jsou vyvolány *Pasteurella* species a *Neisseria meningitidis.*

Nemocniční pneumonie

jsou druhým nejčastějším typem nozokomiální infekce. Riziko vzniku pneumonie stoupá s přítomností základních onemocnění a s různými intervencemi a instrumentálními postupy. Hlavní rizikový faktor je mechanická ventilace. Pacienti s kritickým onemocněním, kteří vyžadují prodlouženou mechanickou ventilaci jsou vnímaví na multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* a *Acinetobacter* species (např. *A. baumannii*). Aerobní gramnegativní tyčinky včetně členů čeledi *Enterobacteriaceae* (jako je *Klebsiella* a *Enterobacter* species) a *P. aeruginosa* jsou původci ventilační pneumonie (Ventilator Associated Pneumonia = VAP) v 60% případů. Intravaskulární katétry a nosní nosičství jsou rizikové faktory pro pneumonii způsobenou meticillin rezistentním *S. aureus* (MRSA).

Aspirační pneumonie

se vyskytuje tam, kde se orofaryngeální obsah dostane do dolního respiračního traktu. Snížená hladina vědomí, například po úrazu hlavy anebo po předávkování drog, je rizikovým faktorem, stejně jako slabý polykací a kašlací reflex, které se rozvinou po iktu nebo z jiných neurologických příčin.

Plicní absces

může být sekundární při aspirační pneumonii, při čemž je nejčastěji postižen střední segment pravé plíce. Ostatní organismy mohou vyvolat tvorbu mnohočetných abscesů. Přítomnost mnohočetných malých abscesů (<2cm v průměru) se někdy označuje jako **nekrotizující pneumonie** nejčastěji vyvolaná *S. aureus* a *K. pneumoniae.* Nokardióza se vyskytuje téměř vždy v případě imunosuprese a může se projevit jako plicní abscesy nebo jako nekrotizující pneumonie. Abscesy mohou vzniknout v důsledku hematogenního rozsevu infekce ze vzdáleného ložiska např. u infekční endokarditidy. Skupina *S. anginosus (S. anginosus, S. constellatus* a *S. intermedius*) byly izolovány z případů plicních abscesů jako polymikrobiální infekce orálními anaeroby. *Burkholderia pseudomallei* může způsobit plicní abscesy nebo nekrotizující pneumonií u lidí, kteří navštívili endemické oblasti (zejména jihovýchodní Asie a severní Austrálie) zvláště pokud mají cukrovku. Lemiérrův syndrom neboli nekrobacilóza může vznikat po akutní orofaryngeální infekci. Infekční tromboflebitida vnitřní jugulární vény vede k septické embolizaci a metastatické infekci. Nejčastěji jsou u tohoto onemocnění postiženy plíce a dochází k tvorbě multifokálních abscesů. Nejčastější patogen izolovaný z hemokultur u pacientů s tímto syndromem je *Fusobacterium necrophorum*.

Cystická fibróza (CF)

Cystická fibróza je způsobena defektem v regulátorovém genu pro transmembránový přenos, který postihuje transport iontů a vody přes epitelie. To vede k progresivnímu plicnímu onemocnění sdruženému s plicními infekcemi, které jsou hlavní příčinou nemocnosti a úmrtnosti u pacientů s CF. Hlavními patogeny jsou *S. aureus, H. influenzae* (obvykle neopouzdřený u pacientů CF), *S. pneumoniae* a pseudomonády, zvláště mukoidní kmeny *P. aeruginosa*. Z jednoho vzorku mohou být izolovány kmeny *P. aeruginosa* s různou citlivostí na antibiotika. Vyskytují se zde rovněž anaeroby spolu s *Aspergillus fumigatus* a mykobaktériemi jinými než *Mycobacterium tuberculosis* (MOTT).

Rezistence na antibiotika, zvláště u *Burkholderia cepacia* komplex*, Stenotrophomonas maltophilia* (obě předtím byly v rodu *Pseudomonas*) a *P. aeruginosa,* omezují možnosti léčby.

Bez ohledu na výsledky citlivosti in vitro je při léčbě infekce vyvolané *Stenotrophomonas maltophilia* indikován cotrimoxazol. Nukleotidová analýza sekvencí *recA* genu ukazuje, že *Burkholderia cepacia* komplex sestává z devíti blízce příbuzných genomovarů. Většina z nich však nyní byla klasifikována jako zvláštní druhy (*B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. stabilis, B. vietnamiensis, B. ambifaria, B. athina, B. pyrrocinia*). Může docházet k přenosu *B. cepacia* komplexu mezi pacienty a někteří pacienti podléhají *B. cepacia* syndromu, což je rychle se rozvíjející smrtící pneumonie, někdy doprovázená septikémií. Byl rovněž popsán nozokomiální přenos *Burkholderia gladioli*.

Infekci u pacientů s CF vyvolávjají rovněž houby, zvláště *Aspergillus* species a ne vždy odpovídají na antibiotickou terapii. *Aspergillus fumigatus* je nejčastější druh aspergilu, který infikuje lidi. Plicní projevy hostitele bez většího postižení buněčné nebo humorální imunity zahrnují alergickou bronchopulmonální aspergilózu u pacientů s astmatem nebo s cystickou fibrózou.

Mykobakteriální onemocnění

Primární plicní infekce vyvolaná *Mycobacterium tuberculosis* může vést k vytvoření primárního komplexu, zejména v dětství. Plicní ložisko může být relativně malé, ale drénující lymfatické uzliny bývají velmi zvětšené a mohou prasknout a rozšířit infikovaný materiál do ostatních oblastí plic. V tomto stádiu dochází k miliárnímu šíření do ostatních orgánů cestou krve a lymfatických cest. Adolescenti a dospělí mohou mít asymptomatickou primární infekci, typicky primární komplex nebo infekci, která se rozvíjí do typické chronické kavitární tuberkulózy. Chronická kavitární nemoc je obvykle vidět u reaktivované primární infekce a nejčastěji jsou postižené plicní hroty. Kašel, který doprovází tento proces, je doprovázen aerosolem infekčních částic, kterými se infekce může přenášet na jiné osoby. Netuberkulózní mykobaktérie mohou být příčinou lidského onemocnění zvláště u lidí imunosuprimovaných nebo se závažným hlavním onemocněním. Patří mezi ně *Mycobacterium avium-intracellulare, M. kansasii, M. malmoense, M. xenopi, M. fortuitum* a *M. haemophilum*. Jsou často rezistentní na standardní antituberkulotickou chemoterapii. Mykobakteriální onemocnění mohou být spojena s chronickou plicní aspergilózou.

Infekce vyvolané nokardiemi a aktinomycetami

Nokardióza a aktinomykóza jsou vzácné diagnózy, které mohou postihnout kromě plíce i jiné systémy. *Nocardia* species je nejčastěji vidět v plicích, kde může způsobit akutní, často nekrotizující pneumonii. Ta bývá sdružena s kavitací. Může také vyvolat pomalu se zvětšující plicní uzel a pneumonii často spojenou s empyémem. Imunodeficience mohou různé příčiny, počínaje alkoholismem až po orgánovou transplantaci a HIV infekci a tyto imunodeficience jsou přítomny u většiny pacientů (60 % <), kteří mají nokardiózu.

Actinomyces species způsobuje hrudní infekci, která může postihnout plíce, pleuru, mediastinum nebo stěnu hrudníku. Případy často probíhají nerozpoznané, dokud se neobjeví empyém a nevyvine se píštěl hrudní stěny. Aspirace orálního obsahu je rizikový faktor pro rozvoj hrudní aktinomykózy a tudíž predisponujícími podmínkami jsou alkoholizmus, iktus, předávkování drogami, celková anestézie, epilepsie, diabetické koma nebo šok.

Vhodné vzorky pro vyšetření obou těchto organizmů jsou hnis, tkáň a bioptické vzorky, viz (PP_v přípravě)

Parazitární infekce

Některé infekce červy mohou vyvolat syndrom tropické plicní eosinofilie, charakteristický skvrnitým pulmonálním infiltrátem a eosinofilií a doprovázené příznaky jako je kašel, horečka a ztráta váhy. Tyto příznaky a symptomy jsou sdruženy s průchodem larválních forem plícemi a jsou vyvolány *Ascaris lumbricoides*, měchovci a *Strongyloides stercoralis*. Motolice plicní (angl. lung fluke), *Paragonimus westermani* má velké rozšíření a zvláště se vyskytuje na dalekém východě, indickém subkontinentu a západní Africe. Lidské infekce jsou získány požíváním nevařených sladkovodních krabů nebo langust, které hostí encystované metacerkarie. Ačkoliv infekce mohou být asymptomatické, těžké infekce se projevují plicním infiltrátem, který může progredovat do chronického produktivního kašle s bolestmi na hrudníku. Vajíčka *P. westermani* jsou prokazatelná ve sputu.

Houbové infekce

Invazivní plicní aspergilóza je neustále vzrůstající běžný problém u hospitalizovaných pacientů, kteří dostávají kortikosteroidy, zvláště u pacientů, kteří jsou imunokompromitovaní a těch kteří mají předchozí plicní nemoc. Většina z nich nebyla nikdy diagnostikována, kvůli nízké citlivosti používaných testů, anebo byla prokázána, ale pozdě. *Aspergillus fumigatus* je nejčastější druh aspergila, který infikuje člověka. Užití testu na galaktomanan ze séra a z BALu, zvyšuje diagnostický výtěžek, podobně jako výzkumné studie, které užívají molekulární detekční metody. Plicní projevy u hostitele bez velkých výpadků celulární nebo humorální imunity zahrnují alergickou bronchopulmonální aspergilózu u pacientů s astmatem nebo s cystickou fibrózou, chronickou kavitární pulmonální aspergilózu a jednoduchý aspergilom.

Pneumocystová pneumonie je způsobena *Pneumocystis jiroveci* (dříve nazývaný *P. carinii*), je nejčastější příčinou závažné pneumonie u pacientů s pokročilou HIV infekcí a je jedním s příznaků AIDS. Vyskytuje se také u početných jinak imunokompromitovaných dospělých a dětí, ačkoliv u většiny případů je účinná profylaxe cotrimoxazolem. Hlavními příznaky u subakutní pneumocystózy jsou kašel, horečka a hypoxie, obvykle jde o mírné příznaky. Nejlepší diagnostický vzorek je BAL a transbronchiální biopsie, ale tento způsob odběru přináší určité riziko. Vyšetřují se vzorky indukovaného sputa a vzorky získané výplachem ústní dutiny, ale většinou je potřeba použít molekulárních detekčních metod.

Některé neobvyklé houby způsobující zánět dolních dýchacích cest jsou endemické pro určitou geografickou oblast. Ačkoliv mnoho těchto infekcí je subklinických, příležitostně jsou importovány klinicky se projevující případy do Evropy. Vyskytují se u osob s normální imunitou, ale většinou jsou závažnější u pacientů, kteří jsou imunokompromitovaní.
O diagnóze by mělo uvažovat u cestovatelů, kteří přijíždějí z endemických oblastí s respiračním onemocněním nebo pneumonií, zvláště pokud toto onemocnění neodpovídá na standardní terapii. Mezi tyto infekce patří **histoplazmóza** způsobená *Histoplasma capsulatum* (jihovýchod USA, Centrální Amerika); **coccidioidomycosa** způsobená *Coccidioides immitis* a *C. pedrosii* (jihozápad USA, Centrální a Jižní Amerika) a **blastomykóza** způsobená *Blastomyces dermatitidis* (východ USA, Afrika). I když tyto infekce mají rozdílné charakteristiky, je často obtížné je klinicky rozlišit od jiných příčin respiračních infekcí, zvláště v jejich časném stádiu - **paracoccidioidomykóza** způsobená

Paracoccidioides brasiliensis (Centrální a Jižní Amerika) obvykle způsobuje asymptomatickou primární plicní infekci, která se může reaktivovat při poklesu imunitních funkcí.

Cryptococcus neoformans je neobvyklá příčina pneumonie, obvykle u normálního hostitele a může být sdružena s meningitidou. Je rozšířena po celém světě.

Candida species jsou extrémně vzácné příčiny zánětu dolních dýchacích cest. Příležitostné infekce se vyskytují jako výsledek hematogenního rozsevu. Diagnóza je obtížná zejména proto, že dýchací cesty u kompromitovaných pacientů léčených antibiotiky bývají kolonizovány.

Typy vzorků

Bronchoalveolární laváž (BAL)

Na vyšetření jsou zasílány **bronchoalveolární laváž** a **krytý kartáčový odběr odebraný bronchoskopicky**, naslepo odebraný **kartáčový odběr a necílená bronchoalveolární laváž**.

Segment plic je vypláchnut sterilním fyziologickým roztokem, po zasunutí flexibilního bronchoskopu tak, že se získají jak celulární tak necelulární složky epiteliálního povrchu dolního dýchacího traktu. Je to spolehlivá metoda pro vyslovení přesvědčivé etiologické diagnózy pneumonie a jiných plicních infekcí.

Ventilátorová pneumonie (VAP) přináší vysokou úmrtnost, ale je obtížné ji diagnostikovat klinicky a mikrobiologicky. Kritéria pro stanovení diagnózy jsou sporná. Slabá senzitivita a specificita kultivace sputa při diagnóze pneumonie u nemocničních ventilovaných pacientů, vedla k rozvoji různých technik pro získání vzorku z horního respiračního traktu, některé zahrnují použití vláknové bronchoskopie. Čistý bakteriální počet, větší než 10^3 CFU/ml v kartáčovém vzorku získaném bronchoskopicky koreluje s histologickou diagnózou pneumonie. Výsledky u kartáčových vzorků a bronchoalveolárních laváží jsou srovnatelné, jestliže je ustaven cut off 10^4 CFU/ml pro bronchoalveolární laváž, ačkoliv to není doporučeno v této standardní metodě, kvůli optimální metodologii, interpretaci a klinickému významu zůstává kontroverzn. Necílené techniky dávají výsledky srovnatelné bronchoskopickým metodám.

Necílená bronchoalveolární laváž (NBL)

Odsávací katétr, dává se přednost krytému BAL katétru k minimalizaci kontaminace, se zasunuje do endotracheální kanyly, dokud není cítit odpor. Pak se injikuje vhodné množství sterilního fyziologického roztoku a opět se aspiruje. Tato metoda poskytuje vzorek z dolního respiračního traktu bez potřeby bronchoskopie a bez následného rizika transtracheální aspirace.

BAL a NBL vzorky

Ze vzorků BAL je možné vykultivovat bakterie, viry, protozoa a houby odpovědné za infekci plic. Ačkoliv izolace rodu *Aspergillus* z BALu má někdy určitou prediktivní hodnotu u pacientů s invazivním onemocněním, má toto vyšetření nízkou senzitivitu a příchod PCR vedl k rozvoji metod, které překonaly tento problém. Vzorky BAL jsou zvláště užitečné v diagnóze *Pneumocystis jiroveci* (předtím známy jako *Pneumocystis carinii)* pneumonii, pneumonie způsobených *Legionella pneumophila* a pro průkaz *Mycobacterium tuberculosis*, která se projevuje jako pneumonie.

Bronchiální aspirát

Bronchiální aspiráty se odebírají přímou aspirací materiálu z velkých dýchacích cest z respiračního traktu pomocí flexibilního bronchoskopu.

Bronchiální výtěr kartáčkem

Ten používá chráněný kartáčkový katétr bronchoskopu (je to kartáček uvnitř dvou katétrů zatavený a ukončený zátkou z polyetylénglykolu) aby se zabránilo kontaminaci materiálem z dýchacích cest.

Bronchiální výplach

Výplachy z bronchů jsou odebírány podobným způsobem jako bronchiální aspiráty, ale postup zahrnuje aspiraci malého množství vstříknutého fyziologického roztoku z velkých dýchacích cest do respiračního traktu.

Vzorky z chráněného katétru

Materiál se odebírá z plic pomocí bronchoskopu podobným způsobem jako kartáčový bronchiální odběr. Vnitřní a vnější katétr se používá s polyetylenglykolovou zátkou na konci, aby se zabránilo kontaminaci z nazofaryngu. Ve chvíli, kdy se vyšetřující setká s odporem, zátka se vypudí a vzorek se odebírá cestou vnitřního katétru.

Transthorakální aspirát

Tyto vzorky se získají přes hrudní stěnu pomocí jehly zavedené mezi žebry. Tento postup se může provést k odebrání vzorku například u aspergilomu, abscesu nebo jiné fokální plicní léze, která je tímto způsobem dostupná.

Transtracheální aspirace

Transtracheální aspirace je také rizikový postup, a proto se provádí vzácně. Byla popsána jeho klinická užitečnost v definování etiologie akutní bakteriální pneumonie. Technika obsahuje zavedení velké široké jehly obsahující katétr skrz krikotyroidní prostor do trachey. Jehla se potom odstraní a katétr se nechá na místě. Na katétr se připojí stříkačka, která se použije k odsávání sekretu. Pokud se nezíská žádný materiál, vstříkne se 2 - 3 ml sterilního fyziologického roztoku (bez antibakteriálních aditiv) a zkusí se znovu odběr.

Tracheální aspirát

Tracheální aspiráty se odebírají z endotracheální cévky. Ale mají stejné nevýhody jako vzorek sputa.

TECHNICKÉ INFORMACE/OMEZENÍ

Gramovo barvení

Gramovo zbarvení vzorku sputa může být použito k určení kvality vzorku a pro předpověď pravděpodobných patogenů. Určení kvality (validity) vzorku je založeno na počtech polymorfonukleárních leukocytů a dlaždicových epiteliálních buněk (SEC). Purulentní vzorky, se vybírají na kultivaci a nepurulentní vzorky nebo vzorky kontaminované dlaždicovými epitéliemi, mohou být odmítnuty. Mnoho autorů založilo odmítnutí sputa na absolutním počtu dlaždicových epitelií a leukocytů na zorné pole mikroskopu. Jiní založili kritérium odmítnutí na poměru leukocyty/dlaždicové epitélie. Výhoda použití poměru je, že kompenzuje možnost nerovnoměrného rozložení buněk v nátěru. **Sputa by neměla být odmítnuta u pacientů, kteří jsou imunosuprimovaní, tam kde je podezření na legionelovou nebo mykobakteriální infekci, nebo tam kde je obtížné získat nový vzorek**.

Gramovo barvení může být rovněž použito k předpovědi pravděpodobných patogenů podle jejich charakteristického vzhledu. Vzorky sputa často nejsou mikroskopicky vyhodnocovány před kultivací a příprava sklíček pro Gramovo barvení se provádí většinou paralelně se zpracováním vzorků. Nátěr ze sputa je třeba správně interpretovat, protože s použitím antimikrobních léků, mohou být bakterie pozorované v nátěru mrtvé. Nemusí být vhodné identifikovat organizmy, jestliže je jasná masivní kontaminace orofaryngeální flórou. Citlivost Gramova barvení se může lišit a je často závislá odečítajícím pracovníkovi. Je třeba brát v úvahu všechny aspekty vzhledu vzorku, Gramova barvení a kultivace spolu s klinickými příznaky pacienta. Gramovo barvení může identifikovat kvasinky nebo hyfy, ale v tomto případě má nižší vypovídací hodnotu než preparát s KOH a s fluorescenčními projasňovači (Rylux).

Interpretace Gramem barvených nátěrů

Podle počtu bílých krvinek a počtů organizmů byly navrženy různé metody interpretace nátěrů barvených podle Grama. U vzorků BALu obarvených podle Grama může být užitečné předvídat výsledky kvantitativní kultivace. V některém případě je možno zahájit antimikrobiální terapii na základě výsledků Gramova barvení v nátěru ze sputa ještě předtím, než jsou dostupné výsledky kultivačního vyšetření.

Fluorescenční barvení

Při průkazu acidorezistentních bakterií, se dává přednost barvení auraminfenolem, protože je rychleji provedený a je citlivější než Ziehl-Neelsen (Z-N). Auramin pozitivní nátěry mohou být konfirmovány přebarvením Ziehl-Neelsenovým barvením.

Kalkofluorová běloba blankofor a další fluorescenční projasňovače jsou vysoce účinné barvičky, pro vizualizaci houbových hyf. Jsou lehce citlivější než KOH a rychleji se odečítají. Dávají také lepší informaci o morfologii než barvení KOH a jsou schopny rozlišit *Mucorales* (široké neseptované hyfy) od aspergilů, jejichž hyfy jsou úzké, septované a s odstupem vláken v pravém úhlu. Barvení na *Pneumocystis jiroveci*, což je příčina pneumocystové pneumonie, je často fluorescenční. Také se provádí imunofluorescenční mikroskopie na *Legionella species*.

Kultivační média

NAD-suplementovaný krevní agar je horší než krevní a čokoládový agar pro izolaci *H. influenzae* a *S.pneumoniae*. Lehké zlepšení záchytu bylo prokázáno s prodlouženou inkubací (48 hodinová kultivace).

Čokoládový agar lze nahradit čokoládový agarem s bacitracinem, který je inkorporovaný v půdě (nebo čokoládový agar s bacitracinovým diskem). V tomto případě se záchyt *H. influenzae* významně neliší.Na agaru s bacitracinem významně méně roste kompetující flóra a kvantita nárůstu *H. influenze* je vyšší s lepšími možnostmi další izolace.

Burkholderia cepacia selektivní agar je doporučen pro kultivaci vzorků od pacientů s cystickou fibrosou (CF). Selektivně podporuje růst *Burkholderia cepacia* a z tohoto hlediska převyšuje CLED agar. *B. cepacia* selektivní agar podporuje také růst *Burkholderia gladioli* a jiných pseudomonád.

Pro detekci hub je Sabouraudův dextrózový agar jednoznačně mnohem lepší než všechna media používaná pro kultivaci bakterií. U rizikových pacientů by vzorky měly být očkovány rutinně na media určená ke kultivaci hub. Inkubační teplota ovlivňuje záchyt: vzorky s vysokou náloží *Candida* species mohou překrýt růst *Aspergillus* species a kultivace při 42 – 45° C zabraňuje kandidám v růstu, zatímco *Aspergillus* roste. Nižší inkubační teploty snižují nárůst *Mucorales*.

Semikvantitativní kultivační techniky

Semikvantitativní kultivační techniky sputa jsou rychlé, jednoduché a poskytují spolehlivé výsledky. Organizmy způsobující zánět v plicích jsou obvykle přítomny ve sputu ve větších počtech než organizmy, které kolonizují hltan a kontaminují vzorek při vykašlávání. Organizmy jsou nepravidelně distribuovány ve sputu, a to může vést k nepřesným výsledkům. Zkapalnění a pečlivé promíchání sputa zvyšuje uniformitu vzorku. Homogenizace a naředění snižuje viskozitu vzorku bez poškození přítomných organizmů. Jasné výsledky jsou získány kultivací vhodného ředění sputa.

Testování antigenu v BALu

U pacientů s možnou invazivní aspergilózou je detekce aspergilového antigenu užitečným postupem při stanovení diagnózy před nasazením antifungální terapie. Data z početných studií u neutropenických pacientů a pacientů z jednotek intenzivní péče, ukazují na vysokou

senzitivitu průkazu, ve studii však nebyli zahrnuti pacienti s transplantáty orgánů nebo u pacienti s AIDS.

Detekce kryptokokových antigenů v tekutině BALu, umožňuje diagnózu kryptokokové pneumonie.

Molekulární detekční metody

Četné patogeny mohou být prokázány v respiračních vzorcích amplifikací nukleových kyselin nebo polymerázovou řetězovou reakcí. Příchod real-time PCR umožňuje udělat diagnózu během několika hodin. Mnoho testů je dostupných v komerčních kitech. Extrakční systémy jsou specifické pro cílové organizmy, proto například je důležité, aby vzorek nebyl kontaminován DNA před provedením PCR. Metody PCR jsou rychlejšía mnohem citlivější než konvenční metody a mohou rozhodnout o léčbě zejména u nekultivovatelných nebo špatně kultivovatelných agens. *Nemohou však nahradit vyšetření citlivosti u multirezistentních nemocničních patogenů.*

Poznámky k metodám

Komentář ke sputu

Indukované sputum může být zasíláno na vyšetření na *P. jiroveci* – (NSVP 31- Vyšetření na parazity; druhů jiných než krevních).

Komentář k BALu

Kultivace *Mycobacterium* species by měla být prováděna u všech vzorků BALu, vyjma tam, kde to lokální podmínky nevyžadují.

Sputum

Vzorky by měly být popsány s použitím následujících termínů: sliny, sliny s hlenem, mukoidní, mukopurulentní, purulentní a zbarvený krví. (LIMS)

Pro nemukoidní vzorky

S použitím sterilní pipety dejte kapku **centrifugovaného vzorku** (viz. Sekce 4.4.1) na čisté mikroskopické sklíčko. a udělejte kličkou nátěr pro Gramovo barvení.Mikroskopie na legionely, mykobaktérie, a na parazity, K vyšetření přítomnosti houbových hyf se použije preparát s KOH nebo preparát s kalkofluorem.

Sputum

• Přidejte stejný objem do 0.1% roztoku dithiotreitolu nebo N-acetyl L-cysteinu (NALC) ke sputum

• Jemně třepejte přibližně 10 vteřin

• Inkubace při 35-37°C 15 minut s následným jemným třepáním přibližně 15 vteřin, napomůže homogenizaci sputa

• 10 µl homogenizovaného sputa se naředí v 5 ml sterilní destilované vody

• 1 µl kličkou plnou tohoto roztoku se naočkují příslušné typy média na plotnách (viz. Sekce 4.4.2)

• U cystické fibrózy a imunokompromitovaných pacientů inokulujete také 1 µl sputa ředěného ve Sputasolu na další poloviny ploten

U pacientů s cystickou fibrózou, kteří nemají předchozí kolonizaci *B. cepacia* se inokuluje 100 µl na *B. cepacia* medium a inokulum se rozetře po celém povrchu agarové plotny (17).

BAL

• Centrifugujte BAL při 1200 x g po dobu 10 min

• Slijte supernatant a na dně ponechejte dekantát 0.5 ml a resuspendujte v tom zbytku centrifugát

• Použitím sterilní kličky inokulujte každou agarovou plotnu vzorkem (viz. QSOP 52 – Inokulace kultivačních médií).

Semikvantitativní metoda

Všechen materiál je resuspendován v tekutině a provede se trojnásobné sériové ředění (1/10, 1/1000 a 1/100,000). Z těchto ředění se vyočkuje na každou plotnu 0.1ml. Alternativně se s použitím kalibrované kličky vyočkuje 0,01 ml tekutiny. Jestliže je méně než 10 kolonií na plotně, znamená to méně jak 10^3 CFU/ml, mezi 10 -100 koloniemi; 10^3-10^4 CFU/ml, a 100-1000 kolonií; 10^4-10^5 CFU/ml. Diagnostický práh je 10^5-10^6 CFU/ml pro bronchoskopické aspiráty, 10^3 CFU/ml pro krytý kartáčový odběr a 10^4 CFU/ml pro BAL (87).

PREANALYTICKÁ FÁZE

Laboratorní příručka

Administrativní náležitosti, technické informace /omezení

Priorita

Určení priority vzorku se provádí podle dokumentu PP– Urgentní vzorky, stanovení prioritních materiálů, ranní hlášení. I když vzorek sputa nebo BALu není primární prioritou, je prioritou odvozenou u život ohrožujících pneumonií, respiračních selhání s VAP atd.

Zápis do LIS

PP_ Identifikace vzorků, PP – LIS, MP_5 – Uchování vzorků,

Průvodky

LP – Odběr materiálu, F_10- Telefonické konzultace a hlášení neshod při příjmu vzorku

ANALYTICKÁ FÁZE

1 Bezpečnost práce

1.1 Odběr vzorku

Odsávačky nebo kontejnery mají být hermeticky uzavřené v plastovém sáčku.

1.2 Transport a skladování vzorku

Zasílají se vhodné kontejnery v plastickém sáčku.

1.3 Zpracování vzorku

Všechny vzorky mohou pravděpodobně obsahovat rizikovou skupinu organizmů na úrovni BSL 2-3 a musí být tedy zpracovány v mikrobiologickém hazardboxu. Takže počáteční vyšetření a následující práce na vzorcích, které jsou podezřelé, že obsahují *Mycobacterium* species, nebo je podezření na blastomykózy, kokcidioidomkózy, histoplazmózy, parakokcidioidomykózy, nebo peniciliózy, se musí provádět uvnitř biohazardboxu v BSL3 laboratoři (dle údajů na žádance případně po předchozím konsiliu s ošetřujícím lékařem).

Vzorky s kontejnery by měly být umístěny do vhodného stojánku.

Tam kde vznikají infekční aerosoly, je nutno zpracovávat v biohazardboxu.

PR_ Provozní řád, LP_2

2 Odběr vzorků

2.1 Optimální čas odběru vzorků

Všechny vzorky by měly být čerstvé a odebrány dříve, než je zahájena antimikrobiální léčba.

Kultivace na *Legionella* species může být úspěšná i po nasazení antimikrobní terapie

2.2 Správný typ vzorků a metoda odběru

Pro vzorky sputa se požaduje materiál z dolního respiračního traktu, vykašlaný hlubokým zakašláním. Pokud je kašel suchý doporučuje se fyzioterapie, posturální drenáž nebo inhalace aerosolu, což by vše mohlo napomoci k vykašlání sputa. Sliny a vzorky z nosních dutin nejsou vhodné. BAL a přidružené vzorky jsou odebírány specialistou podle lokálního protokolu.

2.3 Vhodné množství a vhodný počet vzorků

Sputum – Ideální je minimální objem 1 ml.

BAL – Je obtížné specifikovat požadovaný objem; v principu, čím větší objem, tím lépe.

LP_2 – Laboratorní příručka Odběr materiálu ,

3 Transport a zpracování vzorku

3.1 Čas mezi odběrem vzorku a zpracováním

Vzorky by měly být dopraveny do laboratoře a zpracovány co nejdříve.

Sputum se může umístit v chladničce po dobu 2 - 3 hodin bez zřejmého úbytku patogenů. Jakékoli další zpoždění může umožnit přerůstání gramnegativních tyčinek a úhyn *Haemophilus* species a *S. pneumoniae*.

Kde jsou potíže s transportem, vzorek se může kultivovat do 48 hodin po odběru. Jestliže vzorky nejsou zpracovány v den odběru, je třeba interpretovat výsledky s ohledem na okolnosti.

3.2 Zachování kvality vzorku

Jestliže se zpracování opozdí, uskladnění v chladničce má přednost před skladováním při pokojové teplotě. Zpoždění více jak 48 hodin je nežádoucí.

MP_1 - Příjem materiálu

4 Zpracování vzorku

4.1 Výběr vyšetření

Dle údajů na žádance k zaslanému materiálu.

Postup zpracování vzorku je určen podle výsledků mikroskopického vyšetření, volba postupu viz dále.

PP_103_Zpracování materiálu z DCD - ředěná sputa, PP_102_Zpracování materiálu z DCD - neředěná sputa

4.2 Vzhled

Sputum

Vzorky by měly být popsány s použitím následujících termínů: sliny, sliny s hlenem, mukoidní, mukopurulentní, purulentní a zbarvený krví.

4.3 Mikroskopie

Provádí se u všech vzorků sputa a BAL po obarvení podle Grama

PP_1_Zhotovení preparátu pro barvení, PP_3_Barvení preparátu dle Grama, PP_4_Barvení preparátu dle Ziehl - Neelsena

4.3.1 Standardní mikroskopie

BAL

Pro mukoidní vzorky

Použijte sterilní kličku, vyberte nejhnisavější nebo krví zbarvenou část vzorku a udělejte tenký nátěr na mikroskopické sklíčko pro Gramovo barvení.

Výsledky Gramova barvení se použijí k okomentování kvality vzorku (tj. jsou to tzv. **vylučovací kritéria**). Jako podklad mohou být použity pro odmítnutí vzorku sputa a uvedení do výsledků přítomnost bílých krvinek a mikroorganizmů.

4.3.2 Doplňkově

Sputum

Barvení podle Grama a Ziehl-Neelsena

PP_1_Zhotovení preparátu pro barvení, PP_3_Barvení preparátu dle Grama, PP_4_Barvení preparátu dle Ziehl - Neelsena

S použitím sterilní kličky naberte plnou kličku homogenizovaného sputa (viz. Sekce 4.4.1.) a proveďte tenký nátěr na mikroskopické sklíčko pro Gramovo barvení

Vzorky obsahující sliny můžou být odmítnuty před homogenizací na základě poměru < 2:1 polymorfonukleárních leukocytů k dlaždicovým epiteliím, což se určí Gramovým barvením při nízkém zvětšení (x100)

Jestliže je vzorek odmítnut na základě mikroskopie, informujte ihned oddělení, klinika, anebo praktika a žádejte o nový vzorek.

Uložte vzorky při 4ºC na nejméně 48 h.

Poznámka: vzorky od imunokompromitovaných, neutropenických, anebo inkubovaných pacientů, nebo vzorky určené pro kultivaci legionel a mykobaktérií SE NESMÍ ODMÍTAT na základě kvality vzorku.

4.4 Kultivace a vyšetření

4.4.1 Homogenizace a zpracování vzorku

PP_103_Zpracování materiálu z DCD - ředěná sputa, PP_102_Zpracování materiálu z DCD - neředěná sputa

Poznámka: Neprodlužujte interval mezi naředěním vzorku a inokulací agarových ploten.

Interpretační poznámky

Diagnostického prahu nemusí být dosaženo, jestli infekce právě začala, anebo je přítomna infekční bronchiolitida. Vzorky od pacientů, kteří dostávali antibiotika, můžou dát také falešně pozitivní výsledky (88).

Zkumavky je třeba řádně zazátkovat, i když jsou vortexovány v biohazardu, protože vortexování narušuje ochranné laminární proudění. Zkumavky by měly být otevírány a uzavírány zásadně v biohazardu.

Kvantativní zpracování vzorků z dolních dýchacích cest viz odkaz na Postup zpracování vzorku z DCD, které vyhovují kritériím validity vzorků z DCD.

Příloha 1 : KULTIVAČNÍ MÉDIA, PODMÍNKY A ORGANIZMY PRO VZORKY SPUTA: KULTIVAČNÍ MÉDIA, PODMÍNKY A ORGANIZMY PRO VZORKY BALu

KULTIVAČNÍ MÉDIA, PODMÍNKY A ORGANIZMY PRO VZORKY SPUTA

Příloha 1a), přepočet baktérií na objem sputa

Příloha 1b), přepočet baktérií na objem sputa

Příloha 1c), přepočet baktérií na objem sputa

4.5 Identifikace

NSVP_1 - Identifikace lékařsky důležitých mikroorganismů pomocí orientačních a komerčních fenotypových metod a metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

4.5.1Minimální úroveň v laboratoři

B. cepacia complex	úroveň species
S. maltophilia	úroveň species
Enterobacteriaceae	úroveň species
Klebsiella pneumoniae	úroveň species
Houby	úroveň rod
H. influenzae	úroveň species
M. catarrhalis	úroveň species
N. meningitidis	úroveň species
Pasteurella	úroveň species
Pseudomonády	"úroveň pseudomonád"
P. aeruginosa	mukoidní nebo nemukoidní druhy
S. aureus	úroveň species
S. pneumoniae	úroveň species
Kvasinky	"kvasinky"
Legionella	viz. NSVP 47
Mycobacterium	viz. NSVP 40
Parasity	viz. NSVP 31

Všechny organizmy by měly být dále identifikovány, pokud je klinická nebo epidemiologická indikace.

4.5.2 Spolupráce s referenčními laboratořemi

Podle pravidel referenčních laboratoří.

Izoláty sdružené s outbreaky, tam kde je epidemiologicky indikováno a organizmy s neobvyklými nebo neočekávanými fenotypy rezistence nebo tam kde je laboratorní případně klinický problém a anomálie, které vyžadují vyjasnění, by měly být zaslány do příslušné referenční laboratoře.

MP8 – Evidence vzorků odeslaných do smluvních a spolupracujících laboratoří.

4.6 Testování citlivosti na antibiotika

Na základě kritérií validity vzorku a podle klinické indikace SOP vyšetřování citlivosti na antibiotika semikvantitativním difusním testem, kvantitativní diluční mikrometodou a metodou E-test.

POSTANALYTICKÁ FÁZE VYŠETŘENÍ

5 Vydávání výsledků

MP7_Kontrola a uvolňovánívýsledků

5.1 Mikroskopie

Pokud je pacient imunokompetentní, oznamte špatnou kvalitu vzorku nebo sliny jako:

„Nevyhovující kvalita vzorku/sliny. Prosím opakujte pokud je klinicky indikováno“.

Popis preparátu v obarvení podle Grama s uvedením kvalitativních a kvantitativních poměrů všech komponent

Oznámit epiteliální buňky, bílé krvinky a mikroorganizmy popsané v preparátu.

Oznamujte přítomnost houbových hyf.

5.1.1 Čas sdělování výsledku

Výsledky urgentní mikroskopie se sdělují telefonicky ihned.

Psaná zpráva, 48 - 72h.

5.2 Kultivace

Oznamujte klinicky významné organizmy izolované a jejich množství, jestli se použije BAL a semikvantitativní metoda nebo

Oznamujte další způsoby, jako: Smíšená flóra horního respiračního traktu

Nepřítomnost růstu jako negativní

Nepřítomnost růstu při specifickém zaměření na organizmy u cystické fibrózy, při ředění 10^{-6}

a oznamují se výsledky doplňkových vyšetření.

5.2.1 Čas sdělování výsledků kultivace

Urgentní výsledky telefonicky nebo elektronicky. Psaná zpráva, 48 – 72 h, případně s mezivýsledkem a s upozorněním, že přijde závěrečný výsledek.

5.2.2 Vyšetření citlivosti na antimikrobní léky.

Podle klinické indikace

5.5. Autorizace a validace výsledku oprávněnou osobou, uvolňování výsledků pro tisk a expedice výsledků

MP7_Kontrola a uvolňovánívýsledků

6 Hlášení orgánům hygienické služby a komisi pro nozokomiální infekce

Pode vyhlášky a místních předpisů.

MP 6_Psaní hlášek, psaní do knih, telefonování nálezů (u nově zachcených případů), Povinná hlášení dle Vyhl.MZ ČR č.473/2008 Sb., ve znění vyhlášek č.275/2010 Sb. A č.233/2011 Sb

7.Materiálně technické a personální zabezpečení

7.1 Personál

Osoby oprávněné podle F_56 - Pracovníci oprávnění provádět SOP a PP, F_70_Plán rozdělení laborantek, MP7_Kontrola a uvolňováníývýsledků

7.2.Přístroje a pomocná zařízení

viz Příloha č.2

7.3.Chemikálie, reagencie a spotřební materiál (tabulka)

viz Příloha 3

F_67_Příjem chemikálií, F_27_Seznam dodavatelů, F_72_Nové šarže k testování

7.5.Prostory

Příjem materiálu, Klinická laboratoř a AS, Identifikační laboratoř

8.Systém kontroly kvality

Viz QSOP_2 - Interní hodnocení kvality v klinické mikrobiologii

MP_22 - EHK

9.Validace a verifikace

Prováděné SOP jsou validovány údaji v recenzované literatuře a Národních SOP (viz. Literature) a jsou verifikovány v rámci EHK v nichž se laboratoř účastní a pomocí IHK a IKK viz odkazy:

Dokumenty SLM ČLS JEP platné pro NASKL a ČIA:
http://www.splm.cz/dokumenty/PSSLP_2.pdf,
http://www.splm.cz/dokumenty/PS_VALVER.pdf , QSOP 2_interní kontrola kvality v klinické mikrobiologii

10.Související dokumentace

ED_Povinná hlášení dle Vyhl.MZ ČR č.473/2008 Sb., ve znění vyhlášek č.275/2010 Sb. A č.233/2011 Sb
K_15 Kniha hlášek a pravděpodobných nozokomiálních kmenů
K_16_Kmeny zaslané do NRL,
LP_1 Laboratorní příručka
MP_2_ Identifikace vzorků
MP_3 - LIS
MP_5 – Uchování vzorků
MP_11 - Manipulace s infekčním odpadem,
MP_20 - Expedice výsledků
PK_1 - Příručka kvality
PR_7 Provozní řád,

MP_11 - Manipulace s infekčním odpadem,
QSOP_1_Řízení dokumentů a záznamů
NSVP_1 Obecné zásady identifikace medicínsky významných baktérií,
SOPTP_1 - Vyšetřování citlivosti na antibiotika semikvantitativním difusním testem, kvantitativní diluční mikrometodou a metodou E-test

11.Literatura

1. **INVESTIGATION OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE, SPUTUM AND ASSOCIATED SPECIMENS** Issue no: 2.3 Issue date: 11.12.09 Issued by: Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and TrainingPage 2 of 27 Reference no: BSOP 57i2.3 www.evaluations-standards.org.uk ,Email: standards@hpa.org.uk
2. **IDENTIFICATION OF AEROBIC ACTINOMYCETES.** Issue no: 1 Issue date: 23.11.09 Issued by: Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training Page: 1 of 15 BSOP ID 10i1 Agency www.evaluations-standards.org.uk Email: standards@hpa.org.uk
3. **Identification of Moraxella Species and Morphologically Similar Organism.** UK Standards for Microbiology Investigations: Issued by the Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA Bacteriology -- Identification | ID 11 | Issue no: 2.1 | Issue date: 20.07.11 | Page: 1 of 16
4. **INVESTIGATION OF SPECIMENS FOR *LEGIONELLA* SPECIES** Issue no: 5 Issue date 09.11.09 Issued by: Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training Page 2 of 19 Reference no: BSOP 47i5 www.evaluations-standards.org.uk, Email: standards@hpa.org.uk
5. **Quality Assurance in the Diagnostic Virology and Serology Laboratory Quality Guidance** | Q 2 | Issue no: 6.1 | Issue date: 11.11.11 | Page: 1-25 UK Standards for Microbiology Investigations | Issued by the Standards Unit, Health Protection Agency
6. **Mallátová N, Hamal P, Kocmanová I., Buchta V.,** Mencl K. **Testování citlivosti mikromycet** k antimykotikům *in vitro* u imunosuprimovaných pacientů – doporučení odborníků s podporou *CELL* a SLM ČSL JEP. **Postgraduální medicína** 2011, 13,příloha č 5 **www.postgradmed.cz**
7. **SUSCEPTIBILITY TESTING.** Issue no: 2 Issue date: 30.10.06 Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Page no: 2 of 38 Reference no: BSOP 45i2 www.evaluations-standards.org.uk, Email: standards@hpa.org.uk
8. 51i1.1 www.evaluations-standards.org.uk Email: standards@hpa.org.uk
9. **INTRODUCTION TO THE PRELIMINARY IDENTIFICATION OF MEDICALLY IMPORTANT BACTERIA.** Issue no: 1.4 Issue date: 25.02.08 Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Page no: 2 of 16 BSOP ID 1i1.4 www.evaluations-standards.org.uk Email: standards@hpa.org.uk
10. **EXAMPLE REFERENCE STRAINS FOR NATIONAL STANDARD METHOD TEST PROCEDURES.** Issue no: 1 Issue date: 01.12.10 Issued by: Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training Page: 1 of 10 BSOP TP 1i1 www.evaluations-standards.org.uk, Email: standards@hpa.org.uk
11. **Best practice approach on internal quality assurance**, Issued by: Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training Page 1 – 14 QSOP 1 df www.evaluations-standards.org.uk, Email: standards@hpa.org.uk
12. **Clinical Microbiology Procedures Handbook,** 3rd Edition, Editor in Chief: Lynne S. Garcia, Book ISBN or Item Number: 978-1-55581-527-1,ASM Press2010

13. **Manual of Clinical Microbiology, 9th** Edition Edited by Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, and Michael A. Pfaller Washington, DC: ASM Press, 2007
14. **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th Edition, Volumes 1 and 2** , Edited by Gerald L Mandell MD MACP, John E Bennett MD MACP, and Raphael Dolin MD. Published by Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005. ISBN 0-443-06643-4.
15. **Kucers' The Use of Antibiotics, 6th Edition.** Lead Editor M. Lindsay Grayson, ASM Press 2010
16. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** George M. Garrity (Editor) 2005, ASM Press.
17. **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria volume 3** Martin Dworkin (Editor), Stanley Falkow (Editor), Eugene Rosenberg (Editor), Karl-Heinz Schleifer (Editor), Erko Stackebrandt (Editor) Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes,, 3rd edition, Springer 2006
18. **Molecular Microbiology, Diagnostic Principles and Practice.** Eds. Persing, Tenover, Versalovic, Tang, Unger, Relman, White, ASM press 2004
19. **Molecular Genetics of Bacteria. 3rd ed.** Snyder, Champnes. ASM press 2007
20. **Manual fo Environmental Microbiology. 3rd ed.** Hurst, Crawford, Garland, Lipson, Mills, Stetzenbach, ASM press 2007
21. **Infectious Diseases in Critical Care Medicine.** Burke A.Cunha, Marcel Dekker, 1998
22. **Antibiogram**. Courvalin, Leclecq, Rice. ASM press, Eska Publishing. 2010
23. **Antibiotics in Laboratory Medicine. 5th ed.** Victor Lorian. Lippincott, Williams and Wilkins 2005
24. **Prevention and Control of Nosocomial Infections. 3rd ed.** R.P.Wenzel. Lippincott, Williams and Wilkins 1997
25. **Hospital Epidemiology and Infection Control. 2nd ed**. CG Mayhall, Lippincott, Williams and Wilkins 1999

14.Související záznamy

F_56 Seznam oprávnění pracovníků podle SOP.
F_58 Evidence šarží - půdy
F_59 Evidence šarží diagnostik – identifikace,
F_59 Evidence šarží disků– citlivosti,
F_70_Plán rozdělení laborantek
ED_Seznam právních předpisů - zdravotnictví – 473/2008 Vyhláška o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce, se změnami č.275/2010 – platná od 12.10.2010 a č. 233/2011 Sb. S platností od 5.8. 2011, LP_žádanka o vyšetření

15. Přílohy

příloha 1. Vyočkování vzorku na kultivační půdy a interpretace způsobů ředění

příloha 2. Přístroje a pomocná zařízení

příloha 3. Reagencie a jejich výrobci

příloha 4. Algoritmus zpracování vzorku NEPATŘÍ SEM