

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

NÁRODNÍ STANDARDNÍ VYŠETŘOVACÍ POSTUP

NSVP_6

-

ZÁKLADNÍ MIKROBIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ HEMOKULTUR METODOU MIKROSKOPICKOU A KULTIVAČNÍ V AUTOMATICKÉM HEMOKULTIVAČNÍM SYSTÉMU

Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP

Vypracoval	Kontroloval	Schválil
MUDr. Josef Scharfen		

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 1/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Rozdělovník

Výtisk č.	Umístění	Odpovědná osoba	Podpis
1	Elektronická forma – WEB SLM ČLS JEP	Eva Mrázková	

Revize

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

Schvalovací proces

Číslo revize	Datum revize	Postup	Odpovědná osoba	Připomínky
1	4.2.2014	Seminář SLM	Scharfen J., Jindrák V., Čermák, P.	scharfen@seznam .cz
2	6.2.2014	Web SLM ČLS JEP	Scharfen, J.	
3	30.5.2014	Platné od		
4				
5				

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 2/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Obsah

Úvod

Technické informace/omezení

1 Bezpečnost práce

- 1.1 Odběr vzorku
- 1.2 Transport a skladování vzorku
- 1.3 Zpracování vzorku

2 Odběr vzorku

- 2.1 Optimální čas pro odběr vzorku
- 2.2 Správný typ vzorku a metoda odběru
- 2.3 Požadované množství a vhodný počet vzorků

3 Doprava a skladování vzorku

- 3.1 Čas mezi odběrem a zpracováním vzorku
- 3.2 Opatření k zachování kvality vzorku

4 Zpracování vzorku

- 4.1 Inkubace lahvíček
- 4.2 Vzhled
- 4.3 Mikroskopie
- 4.4 Kultivační vyšetření
- 4.5 Identifikace
- 4.6 Vyšetření citlivosti

5 Oznamování výsledků

- 5.1 Mikroskopie
- 5.2 Kultivace
- 5.3 Vyšetření citlivosti, interpretace nálezu, doporučení léčby

6 Hlášení

7 Materiální, technické a personální 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

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 3/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

NÁZEV: NSVP_6 Základní mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a v manuálním hemokultivačním systému

1. Účel vyšetření

Hemokultivační vyšetření slouží k průkazu bakterií cirkulujících v krvi pacienta pomocí automatického kultivačního systému. Pozitivní hemokultivační lahvičky signalizované přístrojem jsou vyjmuty z přístroje, provede se mikroskopické vyšetření obsahu lahvičky, na jehož základě se vybere sestava kultivačních půd a sestava antibiotik pro testování citlivosti. Po následném vyočkování je izolát identifikován a je vyšetřena jeho citlivost na antibiotika.

2. Úvod

Symptomy a syndromy

Kultivační vyšetření hemokultur je základní laboratorní diagnostikou bakteriémie, která je typická pro **systémové infekce** endokarditidu a další infekce probíhající pod klinickým obrazem horečky neznámého původu (FUO). Bakteriémie v našich podmínkách nejčastěji souvisí s diagnózou urosepsy, dále s diagnózou infekcí spojených s protetikým materiálem (klouby, štěpy) a s katérovou sepsí. Vitální důležitost mají sepse spojené s pneumoniemi (*Streptococcus pneumoniae*), meningitidou (*S.pneumonie*, *Neisseria meningitidis*). Rychlá diagnostika u těchto infekcí je podkladem pro cílenou antibiotickou terapii a významně snižuje úmrtnost pacientů.

Příčinou bakteriémie mohou být **fokální infekce** z ložisek uvnitř těla, z kožních a slizničních povrchů kolonizovaných rezidentní mikroflórou, která proniká poškozenou sliznicí nebo kůží, z gastrointestinálního traktu nebo přímým zavedením kontaminovaného materiálu do oběhového systému. Baktérie jsou odstraňovány obvykle během několika minut imunitním systémem. Při jeho překonání se objeví projevy systémové infekce. Mortalita závisí na typu infekčního agens a na komorbiditách pacienta.

Dalšími rizikovými faktory jsou cestování v cizině, práce v klinické laboratoři nebo veterinární profesi.

Systémová infekce může být spojena s teroristickým použitím některých bakterií, jako jsou *Bacillus anthracis* (anthrax), *Brucella* species (brucelóza, vlnivá horečka; maltská horečka, středomořská horečka), *Burkholderia mallei* (vozhřívka), *Burkholderia pseudomallei* (melioidóza), *Yersinia pestis* (mor) *Francisella tularensis* (tularémie). Tyto nemoci jsou nebezpečné pro práci v laboratoři (BSL3), při podezření se zpracovávají v centrálně určené laboratoři a podléhají ze zákona hlášení.

Definice

Bakteriémie výskyt bakterií v krvi, přechodný, intermitentní nebo kontinuální.

Přechodná bakteriémie trvá několik minut, je spojena s lékařskými zákroky, chirurgickými výkony na infikované tkáni nebo s instrumentací v oblasti kolonizovaných slizničních povrchů (střevo, ERCP – endoskopická retrogradní cholangiopankreatografie, extrakce zubu, katetrizace močových cest, žvýkání při špatné zubní hygieně, defekace, vymačkávání furunklů, i.v.podávání drog kontaminovanými jehlami nebo kontaminovanými drogami), vyskytuje se rovněž u fokálních infekcí, jako jsou pneumonie nebo pyelonefritida.

Intermitentní bakteriémie je ve skutečnosti přechodná opakující se bakteriémie a je spojena charakteristicky s nedrénovanými intraabdominálními abscesy. Dále se vyskytuje jako pneumokoková bakteriémie při pneumokokové pneumonii. Hemokultury odebrané během

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 4/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kulturační v automatickém a manuálním hemokulturačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

teplot a při rozvoji třesavky mohou být u intermitentní bakteriémie negativní, protože bakterie jsou odstraněny obrannými mechanismy hostitele.

Kontinuální bakteriémie představuje závažnou infekci, která překonala obranu hostitele. Je rovněž charakteristická pro intravaskulární infekce, např. infekční endokarditidu a hnisavou tromboflebitidu. U imunokompromitovaných pacientů může být i ze zdrojů mimo krevní řečiště.

Běžně stačí dva odběry hemokultur (2x2 lahvičky A+AN). Výjimkou je endokarditida, jestliže počáteční odběry byly negativní. Pak se odebírají až 4 odběry.

Septikémie je se často užívá jako synonymum pro bakteriémii, bakterie se při ní množí v krevním proudu, rozhoduje klinická symptomatologie – horečka, třesavka, pokles TK, toxémie, acidóza, třesavka, **syndrom multiorgánové dysfunkce** (Multiple Organ Dysfunction Syndrome = **MODS**). U některých pacientů nemusí být teplota, u starých lidí může být nižší než 38°C, teplota může být rovněž ovlivněna antipyretiky (ARO)

Sepse je klinicky prokázaná infekce se systémovou odpovědí (horečka, tachykardie, tachypnoe).

Septický syndrom je sepsa se sníženou perfúzí orgánů plus jeden z dalších markerů (zvýšený krevní laktát, oligurie, změna vědomí, arteriální hypoxie), jinak také **syndrom systémové zánětlivé odpovědi organismu** = Systemic Inflammatory Response Syndrome (**SIRS**)

Septický šok vzniká u pacientů se septickým syndromem a hypotenzí.

Patogeneze septického syndromu. Klinické příznaky vznikají působením toxických bakteriálních produktů, kvůli odpovědi hostitele nebo z obou důvodů společně. Šok vzniká nejčastěji při gramnegativní septikémii (endotoxin indukuje řetězovou reakci končící produkcí TNF, IL-1 a aktivací komplementu). U grampozitivních bakterií jsou typickým původcem šoku pneumokoky, *Streptococcus pyogenes* sk. A a stafylokoky (peptidoglyken, toxiny – superantigeny – proliferace T lymfocytů produkujících IL-1 a TNF). Antibiotika nemají na průběh šoku žádný vliv, je nutná mechanická ventilace a udržení krevního tlaku.

Pseudobakteriémie izoláty z hemokultury nepocházejí z krevního oběhu pacienta. Kontaminace může vzniknout v kterémkoliv kroku při odběru a zpracování hemokultury.

Bakteriémie podle typu pacientů

Ambulantní pacienti

Bakteriémie u ambulantních pacientů (Community Acquired Bacteremia = CAB) vzniká obvykle u před tím zdravých lidí na základě fokální infekce (pneumokokové pneumonie). Bakterie pocházejí z pacientovy rezidentní flóry nebo z nezjištěného ložiska a způsobují metastatickou infekci (osteomyelitida způsobená *S.aureus*), tyfus, brucelóza.

Nejčastější izoláty od dospělých s CAB jsou *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, jiné Enterobacteriaceae, *Neisseria meningitidis*, β-hemolytické streptokoky.

Chronická meningokokcémie vzniká u pacientů s vrozeným defektem humorální imunity.

Diseminovaná gonokoková infekce se rozvíjí u pacientů s neléčenou kapavkou. Pozor na záměnu s meningokoky.

Nemocniční pacienti

Nemocniční bakteriémie (HAB – Hospital Associated Bacteremia) způsobuje narůstající počet invazivních zákroků (katetrizace, ERCP), imunosupresivní a antibiotická léčba, umělá

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 5/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

ventilace. Příčinou bakteriémie je přímé zavedení bakterií do oběhu nebo oslabení obrany organismu. Typy izolátů se liší podle skupin pacientů a mění se s počtem dní strávených v nemocnici.

Nejčastější izoláty jsou koagulázanegativní stafylokoky, *E.coli*, *S. aureus*, jiné Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, enterokoky, anaeroby, *S. pneumoniae*, kvasinky a mnohé jiné.

Anaerobní bakteriémie se projevuje někdy navzdory používané profylaxi. Vzácná, ale závažná nekrobacilóza (**Lemiérův syndrom**) je anaerobní septikémie způsobená fuzobaktériemi u mladých před tím zdravých lidí, zpočátku se projevuje jako angíny, později dochází k hnisavé tromboflebitidě jugulárních žil s třesavkou a septikémií provázenou vysokou smrtností. Gramovo barvení je diagnostické kvůli charakteristické morfologii *Fusobacterium necrophorum*.

Infekce krevního řečiště u dětí. Etiologie bakteriemií u dětí se v posledních letech změnila kvůli očkování proti *Haemophilus influenzae* typu b, naopak stouply systémové nozokomiální infekce. Nejčastější původci **komunitních bakteriemií** (Community Acquired Bacteremia =CAB) u dětí jsou *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *S. aureus*, *E. coli*. **Nozokomiální původci (HAB)** jsou podobní jako u dospělých, méně se vyskytují polymikrobiální a anaerobní HAB (děti nemají dekubity). **Okulní bakteriémie (kryptogenní sepse)** se vyskytuje u dětí s málo nebo žádnými příznaky, teplota může být jediný (nespecifický) indikátor (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Salmonella* species, *N. meningitidis*). **U novorozenců** *S.agalactiae*, *E. coli*, koagulázanegativní stafylokoky a *Candida* species. Praktický problém představuje malý objem krve, počet a načasování odběrů a kontaminace. Koncentrace zárodků v krevním řečišti je obvykle větší než u dospělých.

Katéetrová bakteriémie. Průkaz zdroje katéetrové infekce u katéetrových bakteriemií nebo fungémii je obtížný. V místě zavedení katétru nejsou obvykle přítomny známky zánětu a obvyklí původci katéetrových infekcí - bakterie z kůže - jsou zároveň nejčastějšími kontaminantami hemokultur. Průkazem je izolace stejného organismu z krve a infekce v místě zavedení katétru nebo z konce katétru, ústup symptomatologie u sepse nereagující na léčbu antibiotiky po odstranění katétru, diferenciální kvantitativní kultivace (\geq desetinásobný rozdíl v kvantitě bakterií v krvi z katétru oproti počtu bakterií z periferní žíly) nebo rozdíl v čase detekce positivity hemokultury (Time To Detection = TTD) u automatických systémů.

Septikémie u těhotných žen. *Listeria monocytogenes* vyvolává akutní horečnatou infekci s možným postižením plodu (granulomatosis infantiseptica, narození mrtvého plodu, novorozenecká meningitis, obdoba u zvířat tzv.zmetání, septický potrat). Vyšetřuje se placenta, očišťky a stěry od novorozenců případně výplach žaludku (**SOP č. – Vyšetření žaludečního aspirátu a stěrů u novorozence**), hemokultury. **Septický potrat** může vést k fatální septikémii matky s perforací uteru. Většina infekcí tohoto typu je polymikrobiální s účastí anaerobů. Klostridiová sepse (zejména u kriminálních potratů) může být letální (klostridia mohou být u některých žen součástí rezidentní flóry pochvy).

Imunokompromitovaní pacienti

Imunodeficiencie vrozená, získaná nebo iatrogenní zahrnuje defekty fagocytózy, komplementu, tvorby protilátek a buňkami zprostředkované imunity, často se vyskytuje u malignit, AIDS, srpkovité anémie, transplantovaných, pacientů na imunosupresivní nebo steroidní terapii. Riziko infekce vzrůstá s neutropénií. Typický je nárůst infekcí nevirulentními původci nebo rezidentní flórou, která se obvykle u imunokompromitovaného hostitele interpretuje jako kontaminanty, tj. koaguláza negativní stafylokoky, enterokoky, viridující streptokoky.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 6/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Hypospleničtí nebo aspleničtí pacienti jsou predisponováni pro fulminantní septikémie vyvolané opouzdřenými baktériemi *S. pneumoniae*, *H. influenzae* a *N. meningitidis* nebo vzácnými původci jako *Capnocytophaga species*.

Spektrum oportunistických organismů se změnilo vzhledem k prodlužování neutropenického období u pacientů (chemoterapie) a prodlužování pobytu v nemocnici, další příčinou je narůstající počet používaných centrálních žilních katétrů (Central Venous Catheter – CVC) na odděleních ARO a JIP a širokospektrých antibiotik. U této skupiny pacientů jsou častější polymikrobní infekce a infekce grampozitivu a oportunními patogeny (nefermentující gramnegativní bakterie, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium species*, *Candida species* a další houby, *Mycobacterium species*, nokardie, viry). Dochází k infekcím různými neobvyklými baktériemi a houbami se zvláštními růstovými nároky.

Mykobakteriální infekce. K nárůstu mykobakteriálních infekcí dochází zejména u pacientů s HIV infekcí a AIDS. (SOP č.: – vyšetření vzorků na *Mycobacterium species*.)

Infekční endokarditida (IE)

IE je infekce srdečních chlopní samostatně nebo s jinými částmi endokardu, obvykle na predisponované lézi nebo vrozeném defektu v místě víření krevního proudu, které podporuje poškození endokardu a usazování krevních destiček. Na poškozeném povrchu se vysráží fibrin, který se sekundárně kolonizuje baktériemi z krevního řečiště a vzniká infikovaná vegetace. Životaschopné bakterie mohou být ukryty v hloubce vegetace a unikají tak imunitními mechanismům hostitele i antibiotické léčbě.

Akutní IE. Kolonizace normální chlopně virulentními baktériemi vyvolává rychlou destrukci chlopně, masivní metastatické šíření infekce, srdeční selhání a rychlou smrt.

Subakutní IE je infekce abnormální chlopně málo virulentními organismy. Je to plíživý proces, bez výrazného metastatického šíření

Dnes existuje nová klasifikace podle Duke 1994, tzv. **Dukova kritéria** podle etiologie a podle anatomických poměrů.

IE na nativní chlopní (NVE – native valve endocarditis).

Revmatické onemocnění srdce kdysi hlavní predispozice pro IE, nyní spíše vrozené srdeční vady, prolaps mitrální chlopně, degenerativní onemocnění chlopní u starých lidí. Většina případů (60-80%) vzniká ve středním věku a u přestárlých pacientů.

IE se může vyskytnout na anatomicky a funkčně normálních chlopních v důsledku některého typu bakteriémie (20% pacientů se septikémií vyvolanou *S. aureus*). Nejčastějšími izoláty jsou orální streptokoky, stafylokoky (80% *S. aureus*), enterokoky, *Streptococcus bovis*. I.V. narkomani a pacienti se závažnými komorbiditami mají jinak vzácné houbové infekce. Vzácní vyvolavatelé se zvláštními nároky skupina HACEK (všichni původci jsou orálního původu, zubní plaky): *Haemophilus aphrophilus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* a *Kingella kingae*; viz (SOP ID č.: – Identifikace *Haemophilus species* a skupiny HACEK). U pacientů s AIDS může být IE vyvolána druhu rodu *Bartonella*.

IE na umělé chlopní (PVE – Prosthetic Valve Endocarditis)

I při účinné léčbě antibiotiky je dnes často infikovaná chlopeň operována s náhradou chlopně kvůli eradikaci infekce nebo kvůli hemodynamickým poměrům v srdci.

Asi u 2% pacientů s chlopní náhradou se rozvine IE, což je asi 20% celkových endokarditid. Nejrizikovější pro rozvoj infekce je náhrada aortální chlopně. **Časný PVE** se rozvíjí do 60 dnů po implantaci, projeví se po 4-6 měsících v důsledku kontaminace

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 7/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kulturační v automatickém a manuálním hemokulturačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

náhrady v peroperační době. Časná PVE má vyšší smrtnost než pozdní PVE, původci jsou obvykle multirezistentní mikroorganismy nemocničního původu v důsledku předchozí peroperační profylaxe a terapie antibiotiky. Nejčastější původci jsou koaguláza negativní stafylokoky, *S. aureus* (i MRSA), gramnegativní tyčinky, *Candida* a *Aspergillus*, streptokoky, enterokoky, *Corynebacterium* species. **Pozdní PVE** vzniká několik let po implantaci chlopně. Dochází k transientní bakteriémii a původci jsou podobní jako u NVE orální streptokoky, stafylokoky, méně gramnegativní tyčinky, *Candida*, *Aspergillus* species, enterokoky a *Corynebacterium* species.

Bioterorismus

Bacillus anthracis. Roste ve standardních hemokulturačních systémech. Aerobní, velké, nehemolytické, nepohyblivé, grampozitivní tyčinky v hemokultuře, likvoru vyvolávají podezření, musí být zpracovávány v BSL3 podmínkách v k tomu určených laboratořích. (SOP č: - Identifikace *Bacillus* species)

***Brucella* species** Drobné, kataláza pozitivní gramnegativní kokobacily, růst pouze na bohatých půdách jako ČK při 37°C v 5% CO₂. Hladké, lesklé kolonie menší než 1 mm nebo menší po 48-72 h inkubace, OXI a URE obvykle +. Je nutno zpracovávat na úrovni BSL3 v referenční laboratoři. **Poznámka:** *Brucella* species může být fenotypově manuálně nebo na Viteku chybně identifikována jako *Moraxella*, *Haemophilus* nebo *Ochrobactrum anthropi* (57).

***Francisella tularensis* (sensu lato)** je velmi nebezpečná v rutinní laboratoři. Při podezření je nutno ji zasílat do NRL (nebo k tomu určené laboratoře), BSL3. Malý, pleomorfní gramnegativní kokobacil, nebude růst na normálních půdách, potřebuje cystein (BCYE, ČK, AB 5% CO₂ 10 dní, malé kolonie 1-2 mm, šedé, hladké, lesklé, CAT+, OXI-).

Burkholderia mallei velmi nebezpečná v rutinní laboratoři, musí se zpracovávat na úrovni BSL3 v k tomu určené laboratoři. Rostla by ve standardních hemokulturačních systémech na běžných půdách

Burkholderia pseudomallei velmi nebezpečná v rutinní laboratoři, BSL3, vyšetřuje se v k tomu určené laboratoři. Rostla by ve standardních hemokulturačních systémech na běžných půdách. Malé bipolární GNT, OXI+, pohyblivá. Po několika dnech R zvrásněné kolonie připomínající *Pseudomonas stutzeri*.

Yersinia pestis velmi nebezpečná v rutinní laboratoři, BSL3, vyšetřuje se v k tomu určené laboratoři. Rostla by ve standardních hemokulturačních systémech na běžných půdách včetně půd selektivních pro *Yersinia* (cefsulodin-irgasan-novobiocin) agar. Malé, bipolární gramnegativní tyčinky, jednotlivě nebo v krátkých řetězcích. Růstová teplota je 28 – 30°C, i 35°C. Pomalu roste 2-3 dny na KA, lesklé, nehemolytické kolonie 2 mm „sázená vejce“, povrch tepané mědi.

Diagnostika bakteriémie a fungémie

Vyžaduje dobrý kulturační systém, správnou laboratorní praxi a dobrou komunikaci s ošetřujícím lékařem.

Hemokulturační systémy

Používá se co nejbohatší médium nutné k záchytu malých počtů náročných bakterií a k neutralizaci nebo odstranění antimikrobních látek (antibiotik nebo přirozených antimikrobních složek krve). Je třeba dbát o snížení rizika kontaminace a o co nejrychlejší detekci bakterií a hub.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 8/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Faktory ovlivňující izolaci původců

Klinické

Způsob odběru, počet odběrů a lahviček, časování, předchozí antibiotická terapie (preanalytická fáze).

Technické

Objem vzorku, půdy, neutralizace antimikrobních látek, inkubační doba a teplota, třepání (míchání) lahviček, atmosféra nad médiem.

Odběr

Se provádí ze správného venepunkčního místa po dezinfekci kůže. Výměna jehel mezi venepunkcemi a inokulací lahviček se nedoporučuje kvůli riziku poranění, tento postup nepřináší významný nárůst kontaminace. Není rozdíl mezi arteriální a venózní krví, kromě diseminovaných houbových infekcí (zde lépe arteriální).

Počet a časování odběrů. Druhý až třetí odběr zvyšuje výtěžnost a umožňuje interpretaci kontaminace. Obvykle stačí u intermitentní pozitivity 2 odběry tam, kde je vztah k horečce a třesavce během 30-60 min po vstupu agens do krevního řečiště (KŘ). Odběr se provádí co nejdříve po vrcholu teploty. Načasování je méně důležité u IE, kde je kontinuální bakteriémie.

Objem krve je nejkritičtější faktorem. Počet zárodků u dospělých je obvykle nízký, obvykle $< 1 \times 10^3$ CFU/L (koloniformní jednotky na litr – Colony Forming Unit). Existuje přímá úměra mezi objemem a výtěžkem, popisuje se 3% nárůst na každý 1 ml krve. Doporučený objem je 20-30ml. Většina moderních systémů doporučuje 10 ml krve do jedné lahvičky. U dětí je v krevním řečišti větší koncentrace bakterií (existují výjimky), ale lze odebrat menší objem krve. U novorozenců se doporučuje 1-2 ml.

Média. Existují aerobní (**A**) a anaerobní (**AN**) lahvičky a speciální lahvičky na *Mycobacterium* species (**BK**) s různými suplementy, antikoagulanty, objemem půdy a s různou atmosférou a přítomností antimikrobních neutralizačních látek. Lahvičky od některých výrobců určené pro striktní aeroby se musí zavzdušnit (ventilovat) (záchyt *P. aeruginosa* and *Candida albicans*)

Poměr krve a bujónu.

Požaduje se poměr 1:15 kvůli neutralizaci antibakteriálního efektu krve, lze použít i poměr 1:5 a 1:10 s přídatkem 0.05% polyanetholsulfonátu sodného (Sodium Polyanethol Sulphonate = SPS). SPS má inhibiční účinek na *Neisseria* species, anaerobní koky, *Streptobacillus moniliformis* a *Mycoplasma hominis* (84).

Neutralizace antimikrobních látek. K neutralizaci se používá přidání betalaktamáz nebo adsorpčního materiálu – pryskyřice, z dalších postupů se používá lýza nebo centrifugace.

Inkubační čas a teplota. U automatizovaných systémů se používá teplota 35-37°C po dobu 5-7 dnů. Při podezření na citlivé bakterie se prodlužuje inkubační doba na 10 dnů s následným vyočkováním, rovněž u IE při antibiotické terapii nebo při infekci houbami a náročnými pomalu rostoucími bakteriemi. Při předinkubaci lahviček při opožděném transportu nemusí některá agens (některé GNT nebo streptokoky) automat zachytit a doporučuje se před vložením do přístroje provést subkulturu naslepo.

Atmosféra nad médiem. Atmosféra závisí na typu lahviček.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 9/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kulturační v automatickém a manuálním hemokulturačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Třepání média. U aerobů zvyšuje záchyt, u anaerobů se neprojevuje, u mykobaktérií snižuje záchyt.

Vyočkování

Při pozitivitě jedné lahvičky v automatu je v 50% pozitivní i druhá lahvička v setu (A,AN). Nedoporučuje se však zároveň vyočkovávat AN lahvičku kvůli zrušení anaerobiózy, pokud není lahvička vyočkována v anaeroboxu.

Slepá nebo závěrečná subkultivace. Není doporučena u automatizovaných systémů pro rutinní hemokultivaci, ale některé mikroorganismy jako *Neisseria species*, *Brucella sp.*, *Francisella sp.*, *H. influenzae* a *Legionella sp.* dávají slabý signál nebo rostou úplně bez viditelných známek růstu. Podobně *P. aeruginosa* a *Candida sp.* U těchto organismů je na odpovídající úrovni BSL doporučena slepá subkultivace.

Nekonzistentní výsledky

Pozitivní signál, pozitivní preparát barvený podle Grama, negativní vyočkování

Abiotrophia sp. (nutriční varianta streptokoků), *S. pneumoniae* po autolýze a náročné organismy, které nerostou na rutinních tuhých půdách. Řešením jsou dodatková nebo suplementovaná média, prodloužená inkubační doba nebo jiná růstová atmosféra v indikacích dle mikroskopie a klinického stavu.

Jestliže je mikroskopicky a klinicky podezření na *S. pneumoniae* je užitečné inokulovat směs lyzované krve a tekuté půdy z lahvičky do čerstvé lahvičky, uvažovat o přímém testování antigenu z lahvičky koaglutinační metodou, případně testovat supernatant na MALDI-TOF nebo pomocí PCR.

Pozitivní signál, negativní gram, negativní vyočkování

Zkontrolovat růstovou křivku automatického systému k vyloučení falešně negativní kultury před závěrem, že jde o falešně pozitivní signalizaci. Důvody pro falešnou signalizaci jsou multifaktoriální (**přístroj, nastavení příliš nízkých prahových hodnot, překročení doporučeného objemu krve nebo vyšetřování krve s vysokým obsahem leukocytů**). U konvenčních systémů může být zákal způsobem spíše vlastnostmi séra konkrétního pacienta, než růstem bakterií).

Pokud však růstová křivka vykazuje růst, pak je třeba použít alternativních barvicích metod, jako je karbolfuchsin, Giemsa nebo Sandiford k průkazu fyzické přítomnosti bakterií. Výsledek může být vodítkem pro volbu vhodného média pro vyočkování.

Negativní signál, pozitivní Gram, negativní vyočkování

Organismy jsou přítomny v médiu, ale nerostou. Další vyšetření je obvykle založeno na vysokém stupni klinického podezření, kdy může jít o *Brucelly*, *Franciselly* nebo *Legionelly sp.*

Hemokultivace post mortem

Jsou diagnosticky použitelné za kontrolovaných podmínek, pokud existuje shoda identifikace izolátu z hemokultur nebo z jiných lokalizací odebraných ante mortem a post mortem. Je nutno interpretovat s opatrností.

Technické informace, omezení

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 10/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Rychlá detekce a identifikace přímo z hemokultivačních lahvíček Použitelné např. při rozlišení *S.aureus* a KNS nebo při testování antigenu přímo z lahvičky při lýze *S.pneumoniae*. Musí se hodnotit s opatrností. Lze např. použít i Vitek nebo MALDI-TOF.

PREANALYTICKÁ FÁZE

[PI – příručka indikací vyšetření](#)

Administrativní náležitosti, technické informace /omezení

Priorita

Stupeň priority 1

[PP - Instrukce k příjmu materiálu na pracoviště](#)

Zápis do LIS

Názvy vyšetření, operací

[PP_ značení vzorků a jejich zápis do systému, PP_ řešení drobných pochybení v preanalytické fázi](#)

Průvodky

Způsob archivace, způsob vyplnění průvodky klinikem, nezbytné informace

[LP – Odběr materiálu, PK, F – neshody na příjmu a jejich řešení, S_ laboratoř a personál, K_ Kniha závad vzorků a průvodek v preanalytické fázi](#)

ANALYTICKÁ FÁZE

1. Bezpečnost práce

1.1 Odběr vzorku

Před použitím zkontrolujte lahvičky, zda nejsou poškozeny nebo zda nemají nějaký defekt. Zkontroluje expirační datum. Nepřikládejte znovu kryt na jehly.

1.2 Skladování a transport vzorku

Vzorky dopravujte v zalepených plastových sáčcích uložených v pevném vodovzdorném vnějším obalu. Při transportu do smluvních laboratoří musí být vzorek zabalen podle zákonných norem pošty.

1.3 Zpracování vzorku

Všechny vzorky musí být zpracovávány na úrovni BSL2, pokud nejde o rizikovou skupinu BSL3 např. *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella* species, *Francisella* species, *Y. pestis*, *B. mallei*, *B. pseudomallei* nebo vyočkování hemokultur z podezřelých případů tyfu nebo paratyfu. Všechny musejí být zpracovány v biohazardboxu BSL3. Při práci tam, kde vzniká aerosol, týká se to i *N. meningitidis*. Všude, kde je to možné, nepoužívejte ostré předměty. Airway jehly k odvodušňování hemokultur se používají dle pokynů výrobce, **jinde u šroubovacích uzávěrů je lépe k vyočkování použít jednorázové pipety**. Materiál od vysoce rizikových pacientů zpracovávejte podle doporučení výrobce a podle místního provozního řádu o zacházení s rizikovými biologickými látkami. S tím souvisí i poštovní a transportní řády pro zasílání infekčního materiálu.

[PR_7 Provozní řád, PREP_ Protiepidemická řád, I_xy Instrukce k zasílání materiálu poštou](#)

2. Odběr materiálu

2.1 Optimální čas pro odběr vzorků. Před zahájením antibiotické terapie, co nejdříve po vrcholu teploty, vyjma IE, kde se toto pravidlo nemusí dodržovat.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 11/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

2.2 Správný typ vzorku a metoda odběru. Pokud se odebírá krev na jiná vyšetření (krevní plyny, sedimentace) z jedné venepunkce, musí být jako první inokulovány hemokultivační lahvičky, aby se zabránilo kontaminaci. Dává se přednost samostatnému náběru krve pro hemokultivaci. **Dezinfekce.** Použijte 2% chlorhexidin v 70% isopropyl alkoholu pro namočení tamponu k dezinfekci kůže pacienta, po provedení dezinfekce nechte kůži uschnout. Odeberte krev z periferní žíly a rozdělte vzorek ve stejném poměru do hemokultivačních lahviček. **Dezinfikujte septum lahviček etanolem, metanolem nebo isopropylalkoholem a nechte zaschnout před vlastní inokulací lahviček. K dezinfekci komerčních hemokultivačních systémů se nedoporučuje používat dezinfekční prostředky na bázi jódu,** protože poškozují integritu butylového gumového septa. K odběru hemokultur nepoužívejte intravenózní katétr nebo jiný podobný přístup, pokud není možný jiný přístup nebo je podezření na katérovou sepsi.

Děti a novorozenci. Použijte se jedna pediatrická lahvička pro malý objem krve, pokud není k dispozici, použijte se jedna aerobní lahvička pro dospělé. Dezinfikujte septum lahvičky etanolem, metanolem nebo isopropylalkoholem a nechte zaschnout (jódomé preparáty jsou nevhodné, protože poškozují zátku). Jestliže je podezření na nekrotizující enterokolitidu, inokulujte kromě pediatrické lahvičky také anaerobní lahvičku.

2.3 Požadované množství a počet vzorků

Dospělí. Odběrem (set) se myslí jedna nebo více lahviček odebraných při jednom odběru (naráz). Celkový objem odebrané krve by měl být 20-30 ml.

Děti a novorozenci. Odebírá se 1-2 ml u novorozenců, 2-3 ml u kojenců a 3-5 ml u dětí do 13 let (preteen) při jednom odběru. **Poznámka.** Nepřekračujte maximální objem krve na aktuální lahvičce podle instrukcí výrobce.

Obecné zásady. Odeberte 2 odběry v kterémkoliv 24 hodinovém intervalu u příslušné septické epizody. U novorozenců odebírejte jednu lahvičku nebo speciální pediatrickou lahvičku.

Průvodka adjustace a značení vzorku. Průvodka je připevněna gumičkou k lahvičce (lahvičkám) a měla by být uložena v nepromokavém obalu. Průvodka obsahuje údaje pacienta (jméno, příjmení, bydliště, rodné číslo, pojišťovnu, diagnózu), údaje ošetřujícího lékaře (jméno, příjmení, zařízení a jeho adresu, IČO, IČP, telefon, podpis lékaře), požadavek na vyšetření, datum a čas odběru, klinické údaje (předchozí léčba antibiotiky a jejich druh a doba trvání, teplota, aj.) Lahvička je popsána jménem pacienta, rokem narození a údajem zaslátelce.

LP – Odběr materiálu,

3. transport a skladování vzorku

3.1 Čas mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním.

Vzorky by měly být co nejdříve dopraveny do laboratoře a inkubovány nebo vloženy do automatického systému.

3.2 Opatření k zachování kvality vzorku.

Při zpoždění transportu nebo při opoždění vkládání lahviček do systému by měly být lahvičky inkubovány při doporučené teplotě co nejdříve po jejich inokulaci (vložit do termostatu) a nesmí být uskladňovány v lednici. Pokud na oddělení není inkubátor, má přednost

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 12/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

uskladnění při pokojové teplotě. Laborantky před vkládáním do systému zkontrolují lahvičky, zda nejeví známky růstu. Pokud je najdou, ihned je vyočkují.

Automatizované systémy. Aby se minimalizovala autolýza např. pneumokoků, vyočkování musí být provedeno ihned po signalizaci positivity.

[I_Příjem a skladování vzorku v laboratoři, PP_Svoz biologického materiálu a rozvoz výsledků a odběrového materiálu. LP - Odběr materiálu, F_výdej odběrového materiálu, S_Seznam odběrového materiálu na příjmu.](#)

4. Zpracování vzorku

4.1 Inkubace lahviček. Umístěte lahvičky do systému podle návodu výrobce, inkubujte je 5-7 dní. Ve specifických případech může být třeba inkubační dobu prodloužit (IE 10 dní).

4.2 Vzhled lahviček. Kontrolujte předinkubované lahvičky (zpožděné transportem) na přítomnost mikrobiálního růstu.

4.3 Mikroskopie. Z pozitivních lahviček (signalizovaných, vyboulené septum, lyzovaná krev, změna barevného indikátoru) proveďte mikroskopické vyšetření. Jemně lahvičky promíchejte několikanásobným převrácením. Dezinfikujte septum lahvičky vhodným dezinfekčním roztokem a nechte zaschnout. Dodávanou jehlou odeberte několik kapek směsi krve a pŕdy (někde buffy coat – tj. bělošedá vrstva leukocytů) na sklíčko, proveďte tenký nátěr (někde lahvičky s pryskyřicí) sterilní kličkou a obarvěte dle Grama. **Poznámka.** Ke snížení počtu vstupů do lahvičky s rizikem kontaminace můžete zároveň provést vyočkování a malé množství dát vedle pro přímou identifikaci z lahvičky (antigen, MALDI). Pokud nejsou nalezeny bakterie, zkontrolujte růstovou křivku u automatických systémů. Pokud ukazuje pozitivní růst, použijte jiný typ barvení, vyočkujte, vraťte lahvičku do systému pro další inkubaci a testování podle návodu výrobce. Nadbytečný objem krve nebo vysoký počet leukocytů může způsobit u automatických systémů falešně pozitivní signál.

Poznámka: malé GNT mohou být brucely nebo francisely, velké GPT mohou být *B. anthracis* viz bezpečnost práce.

[PP Pracovní postupy barvení mikroskopických preparátů, F Seznam měřidel a zařízení, F Karta měřicího prostředku, PP Pracovní postup k hemokultivačnímu automatu VersaTrek.](#)

4.4. Kultivační vyšetření.

Vyočkování a vyšetření izolátu Dekontaminace vzorku se neprovádí při standardním vyšetření (*Mycobacterium* sp. viz příslušná SOP).

Standardní lahvička. Dezinfikujte septum (viz výše). Několik kapek inokulujte na každou plotnu a rozočkujte sterilní kličkou (SOP č.: –očkování kultivačních médií). Inokulujte plotny pro přímé stanovení diskové citlivosti. Pokud není dosaženo správného zákalu, měl by test být opakován z čisté kultury izolátu.

Pozitivní lahvičky z manuálních systémů. Vyočkujte všechny lahvičky z odběru, i když jen jedna vypadala jako pozitivní.

Negativní lahvičky z manuálních systémů. Proveďte slepé vyočkování všech aerobních lahviček, které vypadají po 24-48 h negativní.

Signál pozitivní, kultivace negativní. Zkontrolujte růstovou křivku, pokud je to možné, vylučte falešnou pozitivitu z důvodu vysokého počtu leukocytů ve vzorku. Zvažte podle kliniky a preparátu možnost nutričně deficitních, pomalu rostoucích nebo náročných organismů, jako jsou *Campylobacter* sp., *Brucella* sp., *Abiotrophia* sp., cysteine-dependentní organismy včetně *Francisella* sp., nutričně odchylné streptokoky (Nutritionally Variable

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 13/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Streptococi = NVS), *Legionella* sp., *Helicobacter* sp., kapnofilní organismy, pomalu rostoucí anaeroby. Vyočkejte na vhodná media nebo při nejistotě ohledně možné etiologie proveďte doplňkovou kultivaci (pasáž z původní do nové lahvičky). Zvažte možnost autolýzy (*S.pneumoniae*). Přímý test z lahvičky (antigen, MALDI) a pasáž z původní do nové lahvičky.

Tabulka výběru vhodných půd podle etiologického agens:

viz Příloha 1

[PP_Pracovní postup očkovaní kultivačních médií](#), [F_Seznam měřidel a zařízení](#), [F_Karta měřicího prostředku](#)

4.5. Identifikace

Minimální úroveň v laboratoři. Všechny klinicky významné izoláty by měly být identifikovány do species s výjimkou koaguláza negativních stafylokoků, které jsou interpretovány jako kontaminanty, pokud nejsou nalezeny ve více lahvičkách. V případě endokarditidy a hlubokých abscesů by všechny izoláty včetně KNS měly být identifikovány do species (vlastní pravidla v závislosti na počtu pozitivních lahviček a na stěru z kůže). Organismy považované za kontaminanty není nutno identifikovat do species. Klinicky významné izoláty se uschovávají po dobu nejméně jednoho týdne. Uskladnění izolátů na šikmých agarrech nebo při -20 až -80C po delší dobu potřebné pro další testování (např. typizaci izolátů z nozokomiálních infekcí).

[SOP_Obecné zásady identifikace medicínsky významných bakterií](#), [PP_Stručné pracovní postupy u komerčních identifikačních setů](#), [PP_Pracovní postup identifikace mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie metodou MALDI TOF na přístroji Microflex LT \(Bruker Daltonics\)](#), [pomocí softwaru flexControl s databází Maldi Biotyper 3.0](#), [F_Seznam měřidel a zařízení](#), [F_Karta měřicího prostředku](#), [K_uchování kmenů kmenů při -70°C \(uchovávání kmenů z EHK\)](#).

4.5.2 hlášení referenčním laboratořím

Podle dispozic NRL. Zaslání invazivní izolátů k další typizaci a vyšetření citlivosti se provádí podle [SOP_Obecné zásady identifikace medicínsky významných bakterií](#).

Izoláty v souvislosti s epidemií, izoláty s neobvyklou nebo neočekávanou rezistencí a všude tam, kde je laboratorní nebo klinický problém nebo anomálie, který vyžaduje objasnění, by měly být zaslány do vhodné referenční laboratoře.

[K_Kmeny zasláné do NRL](#), [I_Instrukce k zaslání materiálu poštou](#), [K_Kniha pošty](#), [F_Evidence výsledkových listů ze smluvních laboratořích](#), [S_Seznam smluvních laboratořích \(NRL v SZÚ\)](#)

Vyšetření ve smluvních laboratořích (referenční laboratoře). Informace o nabízených testech, rychlosti vyšetření, dopravě a dalších požadavcích NRL (V případech záchytu organismů s neobvyklou nebo neočekávanou rezistencí a v případech s jakýmkoliv klinickým problémem nebo anomálií vyžadující objasnění je třeba kontaktovat NRL.

4.6. Vyšetření citlivosti na antibiotika

[SOP vyšetřování citlivosti na antibiotika semikvantitativním difusním testem, kvantitativní diluční mikrometodou a metodou E-test.](#) [F_Seznam měřidel a zařízení](#), [F_Karta měřicího prostředku](#), [PP_vyšetření citlivosti mikromycet na antimykotika](#)

POSTANALYTICKÁ FÁZE VYŠETŘENÍ

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 14/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

5. Oznamování výsledků

5.1. Mikroskopie

Gramovo barvení. Zjištěný signifikantní nález ihned telefonicky oznámit a konzultovat, popis je součástí psaného výsledku.

Ostatní doplňková barvení. Zjištěný signifikantní nález ihned telefonicky oznámit a konzultovat, popis je součástí psaného výsledku.

Časové parametry. Telefonicky nebo elektronicky ihned, s konsiliem k léčbě tehdy a tam, kde je třeba. Psaná zpráva 16-24 hod. po signalizaci pozitivitu.

5.2. Kultivace

Všechny izoláty s komentářem u izolátů pochybného významu.

Nepřítomnost růstu

Výsledky doplňkových vyšetření

Čas sdělování výsledků telefonicky, elektronicky, v případě potřeby s avízem očekávaného dalšího výsledku. Negativní výsledky se sdělují po 48 hodinách po vyočkování.

5.3. Vyšetření citlivosti, interpretace nálezu, doporučení léčby: Individuální závažné nálezy ihned telefonicky. Online přenos do NIS ihned po ukončení (obvykle 48 hod) Po kontrole pověřenými osobami se výsledek vydává v tištěné formě svezem, elektronicky šifrovaně mailem na extramurální pracoviště a on-line přenosem z LIS do NIS. Telefonické sdělování výsledků na dotaz pouze zdravotnickému personálu s ověřením totožnosti. Doplňková vyšetření. Rychlé testy (antigen) podle výrobce. *Streptococcus pneumoniae* MALDI, antigen, PCR. Výsledky vyšetření citlivosti se sdělují podle klinického významu izolátu. Hodnocení výsledku v souladu s pracovními postupy a s výsledky interních a externích kontrol. Formát výsledku: „Aerobní (Anaerobní) hemokultivace negativní“, „Sekundárně znečištěno, opakujte“, „Pravděpodobně sekundárně znečištěno při odběru“, poznámka: Prověřte způsob dezinfekce před odběrem hemokultury. Klinická interpretace nálezů Interpretaci nálezů provádí odečítající v souladu s klinickou preambulí SOP. Doporučená terapie klinickým mikrobiologem Konsilium ke klinickému stavu a k léčba je součástí komunikace při sdělování výsledku. Konsilium se zapisuje do NIS ONTU.

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

[S_osoby oprávněné k uvolňování a validaci výsledků pro tisk a expedici. S_Postupy opravy výsledků, tisk mezivýsledků. I_Sledování doby odezvy vyšetření. I_Aktivní hlášení pozitivních výsledků \(priority, kritické výsledky\). I_Rozdělování expedovaných papírových výsledků. I_archivace výsledků a průvodek, PP_Postup pro změnu zprávy \(konečného výsledkového listu\)](#)

6 Hlášení výsledků Zdravotním ústavům podle zákona (místní a regionální systém hlášení CDC)

Klinicky signifikantní izoláty z likvoru (–kontakty s *N.meningitidis*) se hlásí místní ZÚ, nemocniční kmeny KNI.

Povinné hlášení: *Mycobacterium species*.

[K_Kniha hlášek a pravděpodobných nozokomiálních kmenů, ED-M-Seznam infekčních chorob - příloha k EPIDATu - podléhajících povinnosti hlášení příslušnému orgánu ochrany](#)

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 15/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kulturační v automatickém a manuálním hemokulturačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

[veřejného zdraví, ED: Povinná hlášení dle Vyhl.MZ ČR č.473/2008 Sb., ve znění vyhlášek č.275/2010 Sb. A č.233/2011 Sb](#)

7 Materiální, technické a personální zabezpečení

[F_Seznam dokumentů](#), [F_Seznam knih](#)

7.1 Personál

Osoby oprávněné podle Pracovní náplně, Instrukcí o zpracování materiálu a platné dokumentace pro příslušnou laboratoři.

[F_Odborné kompetence](#), [F_Plán školicích akcí](#), [F_Seznam zaměstnanců OLM I](#), [F_Plán rozdělení laborantek](#)

7.2.Přístroje a pomocná zařízení

viz Příloha 2

[F_Seznam měřidel a zařízení](#), [F_Karta měřícího prostředku](#), [SOP_vyšetření citlivosti na antibiotika](#), [PP_Pracovní postup hodnocení diskového difusního testu s přístrojem Visor](#), [PP_Pracovní postup identifikace s použitím přístroje MALDI-TOF](#),

7.3 Metrologická návaznost, kalibrace metody Pouze tam,kde je to relevantní, kalibrace měřícího zařízení

[F_Seznam měřidel a zařízení](#), [F_Karta měřícího prostředku](#)

7.4.Chemikálie, reagentie a spotřební materiál (tabulka)

Reagentie: Hemokulturační lahvičky fy. Trek

Výrobce1: Trek Diagnostic Systems

[PP_Pracovní návod k obsluze přístroje](#)

[F_Příjem chemikálií](#), [F_Seznam dodavatelů](#), [F_Nové šarže k testování](#)

7.5.Prostory

[F_Seznam dokumentů](#), [F_Seznam knih](#), [F_Záznam o úklidu 1](#), [F_Záznam o úklidu 2](#), [PR_Denní nakládání s odpadem](#), [F_Odpolední služby](#), [F_Služby - víkend, svátek](#), [F_Plán letních dovolených](#), [F_Plán zimních dovolených](#)

8.Systém kontroly kvality

Interní kontrola kvality odečtu a interpretace nálezu

[F_porovnávací kontrola odečítajících](#).

Interní kontrola kulturačních pūd ,

[S_Seznam kontrolních kmenů](#), [F_Evidence šarží – pūd](#), [F_výsledky kontroly růstu](#), [PP_oživování a konzervování sbírkových referenčních kmenů a provedení interní kontroly kvality ATB disků a identifikačních testů – příloha 1 – Seznam referenčních sbírkových kmenů](#)

Interní kontrola identifikace

[S_Seznam kontrolních kmenů](#), [F_Záznamy kontrol identifikace fenotypovou metodou](#), [F_Evidence šarží diagnostik – identifikace](#), [F_Záznamy kontrol identifikace metodou MALDI-TOF](#).

Interní kontrola vyšetření citlivosti na antibiotika Interní kontroly, postupy, Seznam kontrolních kmenů.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 16/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

[F_IHK – Záznamy inhibičních zón kontrolních kmenů](#), [F_kontrola expirace disků](#), [F_kontrola růstu na testovacích půdách](#), [S-Seznam kontrolních kmenů a inhibičních zón dle EUCAST a Urbášková](#), [F_Evidence šarží disků– citlivosti](#),

Externí kontrola EHK, certifikáty, viz archivované výsledky EHK, Plán EHK.

[D_plán EHK](#), [S_seznam smluvních laboratoří \(NRL\)](#), [F_Záznam ranních hlášení s projednáním výsledků EHK](#), [K_EHK – bakteriologie \(archivace výsledků\)](#), [K_NRL - uchování kmenů kmenů při – 70°C \(uchovávání kmenů z EHK\)](#), [F_Zkouška nových vzorků](#), [F_Záznam o neshodě \(prevenci\)](#), [F_Protokol interního auditu](#), [F_Program auditu](#), [F_Přezkoumání systému managementu vedením](#), [F_Seznam neshod](#)

9.Validate a verifikace

Prováděné SOP jsou validovány údaji v recenzované literatuře a Národních SOP (viz. Literatuře) 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_Kniha hlášek a pravděpodobných nozokomiálních kmenů](#)

[K_Kmeny zaslané do NRL](#),

[LP_Laboratorní příručka](#)

[MP_neshody na příjmu a jejich řešení](#),

[MP_Identifikace vzorků](#)

[MP_LIS](#)

[MP_Uchování vzorků](#)

[MP_Manipulace s infekčním odpadem](#),

[MP_Expedice výsledků](#)

[MP_Aktivní hlášení pozitivních výsledků \(priority, kritické výsledky\)](#),

[MP_Příjem a skladování vzorku v laboratoři](#),

[MP_Rozdělování expedovaných papírových výsledků](#),

[PK_Příručka kvality](#)

[MP_Příjem materiálu](#)

[PP_Pracovní postup očkování kultivačních médií](#),

[PP_Svoz biologického materiálu a rozvoz výsledků a odběrového materiálu](#),

[PP_Zpracování výtěru na GO](#)

[PR_Provozní řád](#),

[MP_Manipulace s infekčním odpadem](#),

[S_osoby oprávněné k uvolňování a validaci výsledků pro tisk a expedici](#),

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 17/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

[QSOP_1_Rízení dokumentů a záznamů](#)

[BSOPID_1 Obecné zásady identifikace medicínsky významných bakterií.](#)

[SOPTP_1 - Vyšetřování citlivosti na antibiotika semikvantitativním difusním testem, kvantitativní diluční mikrometodou a metodou E-test](#)

12. Literatura

- 1. INVESTIGATION OF BLOOD CULTURES (FOR ORGANISMS OTHER THAN MYCOBACTERIUM SPECIES)** Issue no: 6 Issue date: 06.07.10 Issued by: Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training Page no: 1 of 34 BSOP 3716 www.evaluations-standards.org.uk Email: standards@hpa.org.uk
- 2. INVESTIGATION OF FLUIDS FROM NORMALLY STERILE SITES** Issue no: 5 Issue date: 23.11.09 Issued by: Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training. Page 2 of 20 Reference no: BSOP 26i5 www.evaluations-standards.org.uk Email: standards@HPA.org.uk
- 3. 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
- 4. 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**
- 5. 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
- 51i1.1 www.evaluations-standards.org.uk Email: standards@hpa.org.uk
- 7. 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
- 8. 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
- 9. 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
- 10. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd Edition,** Editor in Chief: Lynne S. Garcia, Book ISBN or Item Number: 978-1-55581-527-1,ASM Press2010
- 11. 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
- 12. 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.
- 13. Kucers' The Use of Antibiotics, 6th Edition.** Lead Editor M. Lindsay Grayson, ASM Press 2010
- 14. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** George M. Garrity (Editor) 2005, ASM Press.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 18/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Mikrobiologické vyšetření hemokultur metodou mikroskopickou a kultivační v automatickém a manuálním hemokultivačním systému		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

15. **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
16. **Molecular Microbiology, Diagnostic Principles and Practice.** Eds. Persing, Tenover, Versalovic, Tang, Unger, Relman, White, ASM press 2004
17. **Molecular Genetics of Bacteria. 3rd ed.** Snyder, Champnes. ASM press 2007
18. **Manual fo Environmental Microbiology. 3rd ed.** Hurst, Crawford, Garland, Lipson, Mills, Stetzenbach, ASM press 2007
19. **Infectious Diseases in Critical Care Medicine.** Burke A.Cunha, Marcel Dekker, 1998
20. **Antibiogram.** Courvalin, Leclecq, Rice. ASM press, Eska Publishing. 2010
21. **Antibiotics in Laboratory Medicine. 5th ed.** Victor Lorian. Lippincott, Williams and Wilkins 2005
22. **Prevention and Control of Nosocomial Infections. 3rd ed.** R.P.Wenzel. Lippincott, Williams and Wilkins 1997
23. **Hospital Epidemiology and Infection Control. 2nd ed.** CG Mayhall, Lippincott, Williams and Wilkins 1999
24. **Scharfen, J. ml. Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii.** RNDr. František Skopec, CSc - Nucleus HK. 2013

12. Definice, terminologie a zkratky

13. Rozdělovník

[Elektronické úložiště dat ONTU, řízená dokumentace SOP u vrchní laborantky, pracovní postupy a knihy podle laboratoří. Zpracování materiálu laboratoř klinická.](#)

14. Související záznamy

[F_ Seznam oprávnění pracovníků podle SOP.](#)

[F_ Evidence šarží - půdy](#)

[F_ Evidence šarží diagnostik – identifikace.](#)

[F_ Evidence šarží disků – citlivosti.](#)

[F_ 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](#)

[příloha 2. Přístroje a pomocná zařízení](#)

[příloha 3. Reagencie a jejich výrobci](#)

[Příloha č.4 Algoritmus zpracování hemokultur](#)

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: MUDr. Josef Scharfen, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 19/19 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------