



Klinická mikrobiologie IV. praktikum č. 13

Lékařská mikrobiologie – cvičení
Mikrobiologický ústav LF MU

Obsah cvičení

- ▶ Infekce ran
- ▶ Infekce krevního řečiště



Infekce ran (1)

- ▶ Průnik mikrobů přes tělní povrch do jinak sterilních míst
→ závažný nález.
- ▶ Velmi nesourodá skupina – různý původ a lokalizace.
- ▶ **Hnisavé infekce ran:**
 - Doprovázeny infiltrací polymorfonukleárů (reakce IS)
 - Hnis = tekutina obsahující odumřelé leukocyty, živé a mrtvé bakterie, rozkládající se tkáň, ...
- ▶ **Hnisavé infekce povrchových zranění:** nejčastěji *S. aureus* a β -hemolytické streptokoky
- ▶ **Hnisavé infekce hlubokých ran a těžkých poranění:** tetanická klostridia, klostridia plynatých snětí (anaerobní infekce)



Infekce ran (2)

- ▶ **Infekce operační rány:** infekce v místě chirurgického výkonu = **SSI** (Surgical Site Infection)
 - **Agens:** *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*
 - V případě kolorektální chirurgie: *Enterobacteriaceae*, anaeroby (*Bacillus fragilis*, prevotely, peptostreptokoky).
 - Časté zastoupení *Candida albicans*
- ▶ **Poranění ve vodě:**
 - Sladká voda – pseudomonády, aeromonády
 - Slaná voda – halofilní vibria, atypické mykobakterie
- ▶ **Infekce po pokousání:**
 - Člověkem: ústní mikroflóra, zlatý stafylokok
 - Zvířetem: psi a kočky především stafylokoky, pasteurely, pozor na vzteklinu



Infekce ran (3)

▶ **Klasifikace dle hloubky:**

- Povrchové ranné infekce zasahující kůži a podkoží
- Hluboké ranné infekce
- Infekce orgánů a tělesných prostor

▶ **Klasifikace dle míry rizika:**

- Čistá
 - Čistá – kontaminovaná (při operacích míst, která jsou normálně osídlena běžnou mikroflórou)
 - Kontaminovaná (traumatické poranění, bakterie zvenčí)
 - Znečištěná – infikovaná (zánět v ráně)
-



Úkol č. 1 – infekce ran: vzorky (1)

- ▶ Zásadní je **správné vyplnění žádanky** – vyplňuje lékař nebo sestra provádějící odběr.
- ▶ **Nutno specifikovat:**
 - Původ rány / její typ: operační rána, rána po pokousání, bodná rána, ...
 - Lokalizace rány na těle
 - Údaje z anamnézy, jsou-li důležité (pobyt v zahraničí, práce v zemědělství, myslivost)
 - Požadavek na specializované vyšetření, pokud je



Úkol č. 1 – infekce ran: vzorky (2)

▶ Hluboké ložiskové infekce:

- V těchto případech je preferenčním materiálem hnis nebo jiná tekutina v ložisku (obsah cysty, výpotek, ...), stěr je méně preferovaný
- Při podezření na anaerobní infekci (především při infekcích dutiny břišní) → zaslání ve stříkačce (uzavření kombi zátkou)



- Nezasílat stříkačky s jehlou zabodnutou do sterilní gumové zátky!

Úkol č. 1 – infekce ran: vzorky (3)

▶ Hluboké ložiskové infekce:

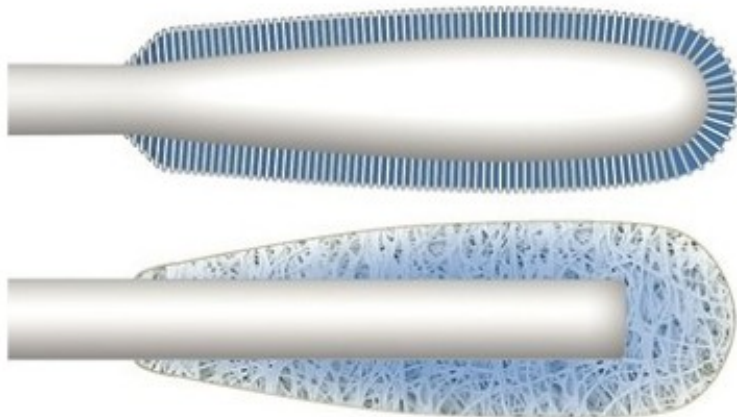
- Pokud nelze zaslat přímo tekutinu (např. při jejím nedostatku), je nutné **použití soupravy s transportní půdou**
- Dnes nejčastěji **E-swab test**
- Někdy je vhodný také nátěr nebo otisk tkáně na sklíčko (zachytí se i nevykultivovatelné patogeny)



E-swab test (1)

- ▶ **E-swab test** je sterilní a obsahuje dvě části:
 - Polypropylenová šroubovací zkumavka s kapalným Amiesovým médiem bez aktivního uhlí
 - Tampon pro vlastní odběr vzorku
- ▶ Tampon je zakončen nástřikem měkkých nylonových vláken a je vyráběn speciálním metodou (ne námotkem jako u klasických souprav) – technologie nástřiku rovnoběžně orientovaných nylonových vláken v elektrostatickém poli.
- ▶ Při odběru dojde k **aktivnímu zachycení mikroorganismů elektrostatickými silami**, nejde pouze o pasivní ulpění v námotku.
- ▶ Lze použít i na PCR (neobsahuje žádné inhibitory reakce).

E-swab test (2)



wikilab.zoolyx.be



mekalasi.fi



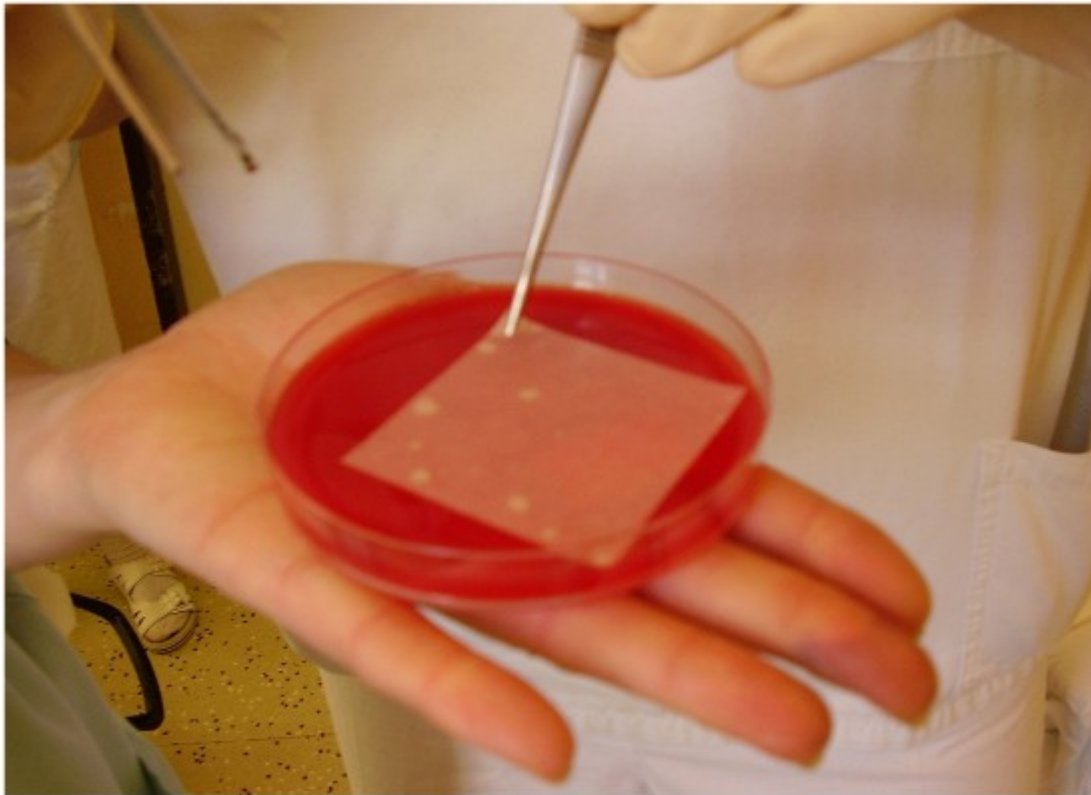
Odběry u infekcí povrchových ran

- ▶ **Stěr** s odběrovou soupravou s transportní půdou (**kvalitativní metoda**):
 - Nutno proniknout až k ložisku infekce, aby došlo skutečně k zachycení patogena
 - Pozor na kontaminaci okolní mikroflórou, především z kůže
- ▶ **Otisková metoda**:
 - U ran plošného charakteru (např. diabetický vřed) – přiložit čtvereček sterilní gázy / filtračního papíru
 - Přenést na kultivační půdu – krevní agar
 - V laboratoři pak přenos na další půdy
 - **Semikvantitativní metoda** (počet/plocha)



Úkol č. 2 – Provedení otisku (1)

- ▶ Lékař obdrží sterilní kultivační půdu a čtvereček o rozměrech 25 cm²



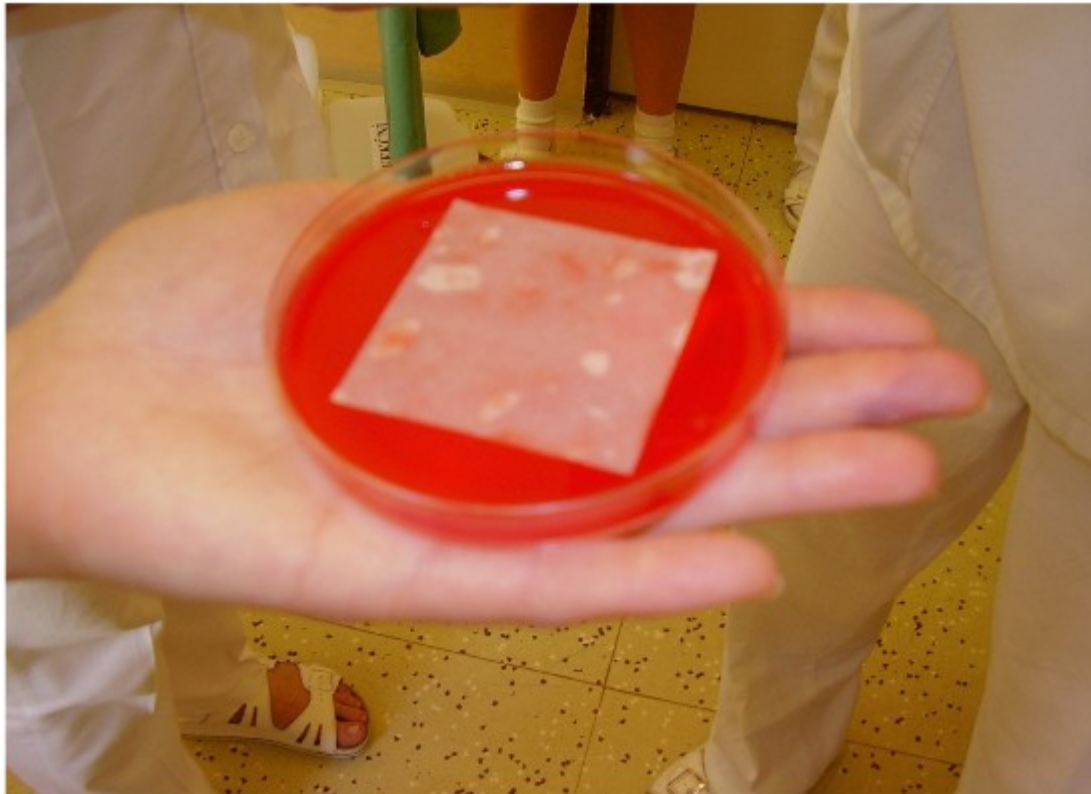
Úkol č. 2 – Provedení otisku (2)

- ▶ Chirurg nebo sestra přemístí čtvereček do rány tak, aby se všude dotýkal (takto se čtvereček ponechá 10 sekund až minut



Úkol č. 2 – Provedení otisku (3)

- ▶ Čtvereček se přemístí zpět na půdu



Úkol č. 2 – Vyhodnocení otisku

- ▶ Po transportu do laboratoře je filtrační papír umístěn na další dvě až tři kultivační půdy
- ▶ Vyhodnocení se provádí po 24 hodinách – odečet mikrobů, často s využitím URI média
- ▶ Neprovádí se pouze identifikace kolonií, ale také jejich kvantifikace (počet CFU/25 cm²)



Diagnostika infekcí ran

▶ Stěry:

- V ráně se nenachází žádná přirozená mikroflóra
- Mnoho různých půd k odhalení širšího spektra patogenů
 - KA, Endo, KA s NaCl pro stafylokoky, KA s amikacinem pro streptokoky a enterokoky
 - Tekuté půdy pro pomnožení – v ráně se může nacházet menší množství mikrobů

▶ Tekuté vzorky:

- Mikroskopie – sledujeme mikroby, množství leukocytů ve vzorku, ...
- Použití tekutých půd pomnožovacích / selektivních



Diagnostické schéma: výtěr z rány

- ▶ **Den 0:** nasazení kultivací
- ▶ **Den 1:** odečet výsledků primokultivace na KA, Endo, KA s 10 % NaCl, KA s amikacinem. Pokud je vše negativní, prohlíží se bujon (pokud je zakalený, vyočkuje se tzv. subkultivace)
- ▶ **Den 2:** odeslání všech negativních a většiny pozitivních výsledků – možné rezistence apod., neposílají se všechny
- ▶ **Den 3:** odeslání dalších pozitivních výsledků



Interpretace: výtěr z rány

- ▶ **Běžná flóra:** žádná není, tudíž každý nález je možným patogenem
- ▶ **Výjimka:** u povrchových ran je možno za kontaminaci přirozenou mikroflórou považovat koagulázanegativní stafylokoky a korynebakteria
- ▶ **Kolonizace:** u povrchových ran může dojít ke kolonizace pseudomonádami a proteem
 - **Kritická kontaminace** = rána se nehojí z důvodu mikrobiálního množení, avšak tkáň není napadena a pacient nejeví známky imunitní odpovědi
- ▶ **Citlivost na ATB** se provádí pro všechny nálezy.



Léčba hnisavých infekcí

- ▶ **Nezbytné lokální ošetřování rány** – lokální ATB, pravidelné čištění, převazy, odstraňování nekrotické tkáně – zde možná i larvoterapie)
- ▶ Pokud neočekáváme přítomnost anaerobů, empiricky nasazujeme k celkové léčbě **oxacilin** (protistafylokokové ATB 1. volby)
- ▶ Očekáváme-li **streptokokového původce**, lékem volby je klasický **penicilin ve vysokých dávkách**
- ▶ **Nozokimální infekce – cílená léčba**



Úkol č. 3 – Vyhodnocení kultivace z hlubších ran

- ▶ S pomocí anamnézy vyhodnoťte výsledky kultivace
- ▶ Oxidázový test – na bočním stole



Mikrobi v krvi

- ▶ Za fyziologických okolností často dochází k přechodné, transientní, bakteriémii – typicky např. při čištění zubů.
- ▶ **Bakteriémie:** přítomnost bakterií v krvi (pouhý fakt, nehodnotí se další klinický význam)
- ▶ **Virémie:** přítomnost virů v krvi, běžné při celé řadě virových onemocnění (HIV, hepatitidy)
- ▶ **Parazitémie:** krevní paraziti, zejména malarická plasmodia, trypanosomy a filárie (vlasovci)



Bakteriální infekce krevního řečiště

- ▶ Bakteriémie = spouštěcí mechanismus sepse
- ▶ Produkty mikroorganismů reagují s imunitním systémem
→ **SIRS**
- ▶ **SIRS** = syndrom systémové zánětlivé odpovědi – zánětlivá reakce organismu na podnět infekční i neinfekční
- ▶ **seps** = **SIRS + infekce**
 - Primární seps – tyfus
 - Sekundární seps – katéetrové, uroseps, abdominální seps
 - Subakutní bakteriální endokarditidy (*sepsis lenta*)



Diagnostika sepse

- ▶ **Nutné komplexní vyšetření:**
 - ▶ **Biochemické:** ukazatele zánětu (CRP, prokalcitonin, krevní obraz), známky diseminované intravaskulární koagulopatie (trombocytopenie, snížení antitrombinu III, ...)
 - ▶ **Fyzikální:** RTG srdce a plic, ORL vyšetření, jícnový ultrazvuk (pro ložiska na srdci), CT
 - ▶ **Neurologické**
 - ▶ **Mikrobiologické:** hemokultury + další materiál (katétry, moč, sputum, lumbální punkce, ...)



Odběr krve pro hemokulturu

- ▶ **Hemokultura** = kultivační vyšetření krve na přítomnost bakterií / kvasinek
- ▶ **Nesrážlivá krev!!!** Prokazujeme zde živé mikroby, nikoliv antigeny nebo protilátky jako v sérologii
- ▶ Na odběr se používají speciální lahvičky s transportně-kultivačním médiem pro automatickou kultivaci
- ▶ Riziko **pseudobakteriémie** – falešně pozitivní výsledek
- ▶ **Dospělí:** odběr 20 – 30 ml krve
- ▶ **Děti:** 1 – 5 ml, dle věku (náročnější odběr, u dětí má význam i menší počet bakterií)
- ▶ **Nutnost vyznačit čas a místo odběru!**



Úkol č. 4 – Druhy hemokultivačních nádobek

- ▶ Typy dle toho, jaký organismus má být preferenčně zachycen
- ▶ Některé nádobky s aktivním uhlím (především u hemokultur pacientů s ATB terapií) ke snížení procenta falešně negativních výsledků (ATB by potlačilo růst)
- ▶ **Nejběžnější typy nádob:**
 - **Aerobní standardní**
 - **Aerobní s aktivním uhlím**
 - **Anaerobní s aktivním uhlím**
- ▶ **Nutnost vyznačit čas a místo odběru!**



Nádobky na hemokultivaci



BacT/ALERT



BACTEC

Automatické kultivátory (1)

- ▶ Kultivátor propojený s PC – udržuje automaticky optimální podmínky.
- ▶ Vyhodnocuje se stav nádobky a indikuje případný růst (např. pomocí změny optických vlastností lahvičky – změna reflektance).
- ▶ **Zvuková a optická signalizace růstu.**
- ▶ Pokud týden nic neroste, signalizuje se negativní výsledek.



Automatické kultivátory (2)



foto: O. Z.



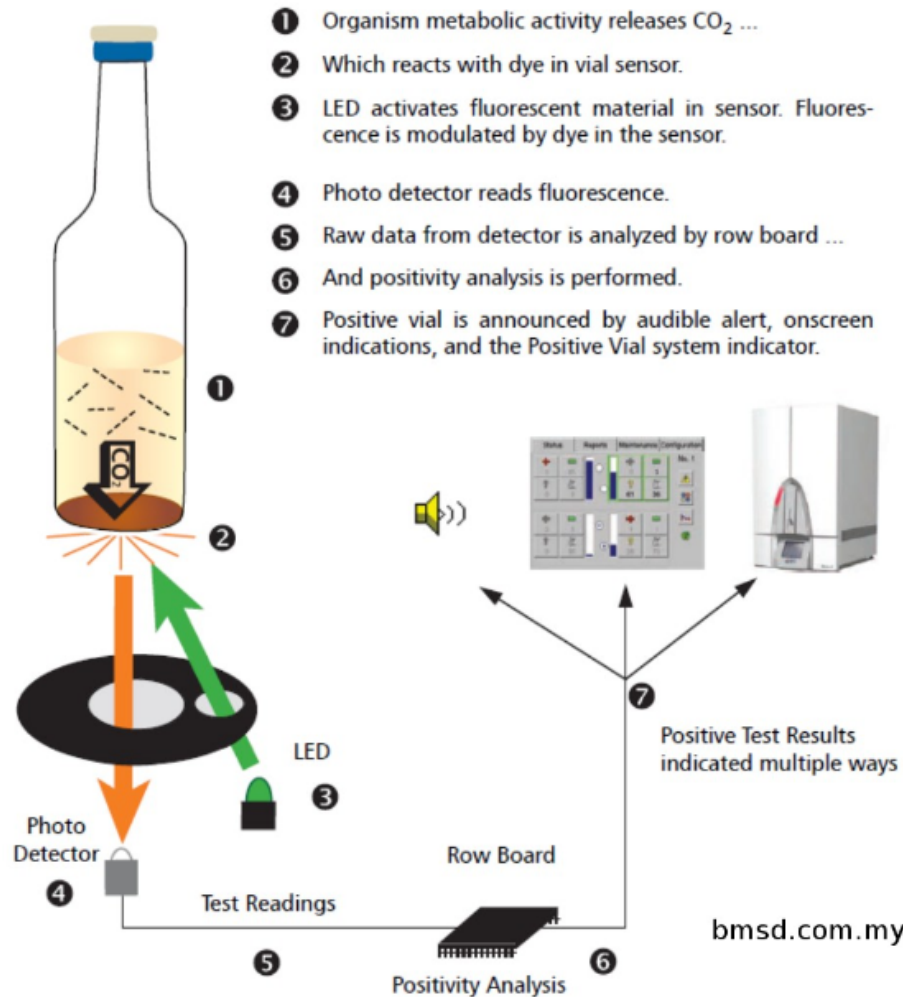
Automatické kultivátory (3)



foto: O. Z.



Princip automatického kultivátoru BACTEC



Příčiny pseudobakteriémie

- ▶ Falešně pozitivní výsledek
- ▶ Důsledek **nevhodně provedeného odběru** (porušení zásad asepse)
- ▶ Nutno provádět odběr pouze **ze zavedených vstupů** – záchyt bakterií kolonizujících příslušný vstup, což nemusí být skutečný původce bakteriémie
- ▶ **Důsledek:** pacient je léčen pro infekci, která neexistuje nebo pro infekci jiným druhem mikroba → zpomaleno či dokonce zastaveno hledáno skutečného agens



Prevence pseudobakteriémie

- ▶ **Cílený odběr** – pokud je přítomnost bakterií v krvi pravděpodobná. Odběr neprovádíme, pokud je indikováno jiné vyšetření.
- ▶ **Odběr v dostatečné kvantitě:** jedna hemokultura je bezpředmětná, dvě s limitním významem, optimálně tři (v praxi se však většinou odebírají dvě)
- ▶ **Odběr z vhodných míst:** nejméně jedna hemokultura z venepunkce (3 venepunkce ideální + odběr z žilního katétru)
- ▶ **Odběr ve vhodnou chvíli:** typicky při vzestupu teploty u septických stavů
- ▶ **Asepsy, správná nádobka, správně vyplněná průvodka**

Identifikace pseudobakteriémie

- ▶ **Typické znaky falešně pozitivní hemokultury:**
 - **Pozitivní jen některé ze tří hemokultur**
 - **Pozitivní všechny, ale z každé vyroste jiný kmen** (různý vzhled kolonií, různá ATB citlivost) **za různě dlouhou dobu** (odpovídá různé kvantitě; normální je rozmezí 5 – 6 hodin)
 - **Klinické potíže pacienta neodpovídají nálezu**
 - **Stejný kmen je nalezen i na kůži pacienta**



Posouzení času positivity

- ▶ **TTD = time to detection** (čas do positivity) = čas od odběru do okamžiku, kdy automat hlásí pozitivitu
- ▶ TTD je kratší, pokud je v krvi přítomno masivní množství bakterií v krvi a delší pokud je bakterií v krvi málo
- ▶ Skutečné bakteriémie = čas je většinou kratší (max. 48 hodin) a u všech odebraných hemokultur přibližně stejný
- ▶ Čas může být kratší u hemokultury z místa, které je zdrojem infekce (hemokultura z centrálního venózního katétru, který může být zdrojem katéetrové sepse)
- ▶ **Nutnost vyznačit čas a místo odběru! Jinak nelze vyhodnotit!**



Pozitivní hemokultura

- ▶ Po vyjmutí lahvičky z přístroje je **nutno zaevidovat čas od doby příjmu do positivity** (čím delší doba, tím pravděpodobnější je kontaminace)
- ▶ Poté vyočkování na pevné půdy a nátěr na sklo barvený Gramem
- ▶ Orientační diskový test citlivosti na ATB v závislosti na výsledcích Gramova barvení (nebarví se běžná suspenze, ale přímo tekutina z lahvičky → pouze orientační výsledky)
- ▶ Další den kvantitativní ATB test (už je k dispozici standardní inokulum)



Úkol č. 5, 6, 7: Hemokultury

- ▶ **Úkol 5:** mikroskopujte výsledek hemokultury, popište bakterie včetně jejich uspořádání
- ▶ **Úkol 6:** popište výsledky kultivačních testů, vyhodnoťte výsledky předběžného testu na ATB
- ▶ **Úkol 7:** pokuste se vhodně interpretovat vzorky hemokultur (pracujte nejen s nalezeným patogenem, ale také s TTD a místě odběru krve)



Úkol č. 7: Interpretace nálezů (1)

▶ Jan Bílý:

- 3 hemokultury odebrány, všechny pozitivní, všechny v zhruba stejném čase po odběru (10/13/13,5 hodin), podobný vzhled kmenů → nejspíše je nález skutečným agens
- Vzorek krve s kratším časem (10 hodin) byl odebrán z centrálního žilního katétru – možná domněnka, že právě tento katétr je zdrojem infekce



Úkol č. 7: Interpretace nálezů (2)

▶ **Jakub Černý:**

- 3 hemokultury, všechny pozitivní, avšak po odlišné době – 8 hodin, 26 hodin a 38 hodin
- Kmeny jsou fenotypově odlišné, odlišná citlivost na ATB, dokonce různé druhy stafylokoky → pravděpodobně kožní kontaminanty

