

**P13**

# **Klinická mikrobiologie IV**

**Infekce ran a krevního  
řečiště, biofilm na cévních  
katetrech**

# Osnova

- infekce ran + úkoly
- infekce krevního řečiště + úkoly
- průkaz mikrobů kolonizující cévní katetry + úkoly
- udělení zápočtů

# Infekce ran

- nesourodá skupina (různý původ a lokalizace)
- závažné případy (mikroby pronikly přes tělní povrch na místa normálně sterilní)
- **hnisavé infekce ran:**
  - bakteriální infekce rány doprovázena infiltrací polymorfonukleárních granulocytů (odpovědi IS)
  - hnis = tekutina obsahující odumřelé leukocyty, bakterie (živé i mrtvé), rozkládající se tkáň, aj.
- **hnisavá povrchová zranění** (*S. aureus*,  $\beta$ -hemolytické streptokoky)
- **těžká poranění** (hrozí klostridiové anaerobní infekce, tetanus)

# Infekce ran (2)

- **infekce operační rány:**

- SSI – surgical site infection – „infekce v místě chirurgického výkonu“
- *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*
- kolorektální chirurgie: *Enterobacteriaceae*, ananeroby (*B. fragilis*, porfyromonády, prevotely, peptostreptokoky)
- vzrůstá zastoupení *C. albicans*
- prevence a léčba jedním z důležitých témat pro chirurgy

# Infekce ran (3)

- **poranění ve vodě:**
  - sladká voda: pseudomonády, aeromonády
  - slaná voda: halofilní vibria, atypické mykobakterie
- **popáleniny:** velmi snadná infekce (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, aj.)
- **infekce po pokousání:**
  - člověkem: příslušníci normální ústní mikroflóry (aerobní i anaerobní) a *S. aureus*
  - zvířetem: psi a kočky (nejčastěji stafylokoky a pasteurely), počítat s možností přenosu vztekliny

# Úkol 1: vzorky u infekcí ran

- odebírající lékař (sestra) musí vždy pečlivě vyplnit žádanku, nestačí „stěr z rány“
- nutno specifikovat:
  - **typ (původ) rány** – operační rána, rána po pokousání, bodná rána apod.
  - **lokalizaci rány** na těle
  - důležité anamnestické údaje (návrat ze zahraničí, práce v zemědělství)
  - případně i požadovaná speciální vyšetření

# Úkol 1: vzorky u infekcí ran (2)

- **hluboké ložiskové infekce:**

- **hnis** či jiná **tekutina v ložisku** v dostatečném množství (výpotek, obsah cysty apod.) má přednost před stěrem
- u podezření na anaerobní infekci (zejména hnis z dutiny břišní) **zaslání ve stříkačce** (uzavření stříkačky tzv. kombi zátku (na obrázku)
- **nezasílat stříkačky s jehlou** zabodnutou do sterilní gumové zátky (dřívější doporučení, opuštěno z bezpečnostních důvodů)



# Úkol 1: vzorky u infekcí ran (3)

- **hluboké ložiskové infekce:**

- není-li možno poslat tekutinu (je nedostatek tekutiny), bezpodmínečně nutné **použití soupravy s transportní půdou**
- v poslední době tzv. **E-swaby**
- v některých případech je také **vhodný nátěr**, případně **otisk** tkáně na sklíčko (zachytí se i patogeny, které se nepodařilo vypěstovat)
- v zvláště závažných případech může chirurg přizvat mikrobiologa i přímo na operační sál

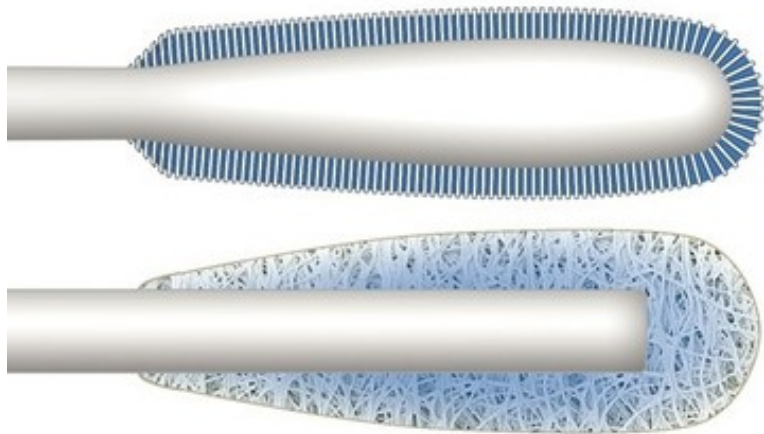


# E-swab (1)

- sterilní a obsahuje dvě části:
  - polypropylénovou šroubovací **zkumavku s kapalným Amiesovým transportním médiem**
  - **tampon** pro vlastní odběr vzorku
- tampon zakončen nástřikem měkkých nylonových vláken
- vyráběn technologií nástřiku rovnoběžně orientovaných nylonových vláken v elektrostatickém poli (není to námotek jako u klasických souprav)
- **mikroorganismy** jsou při odběru **aktivně zachyceny** elektrostatickými silami (u klasického odběru jen pasivně ulpívají v námotku)

# E-swab (2)

- obsahuje tekuté Amiesovo médium bez aktivního uhlí
- lze použít i na PCR (neobsahuje nic, co by mohlo inhibovat amplifikaci)



wikilab.zoolyx.be

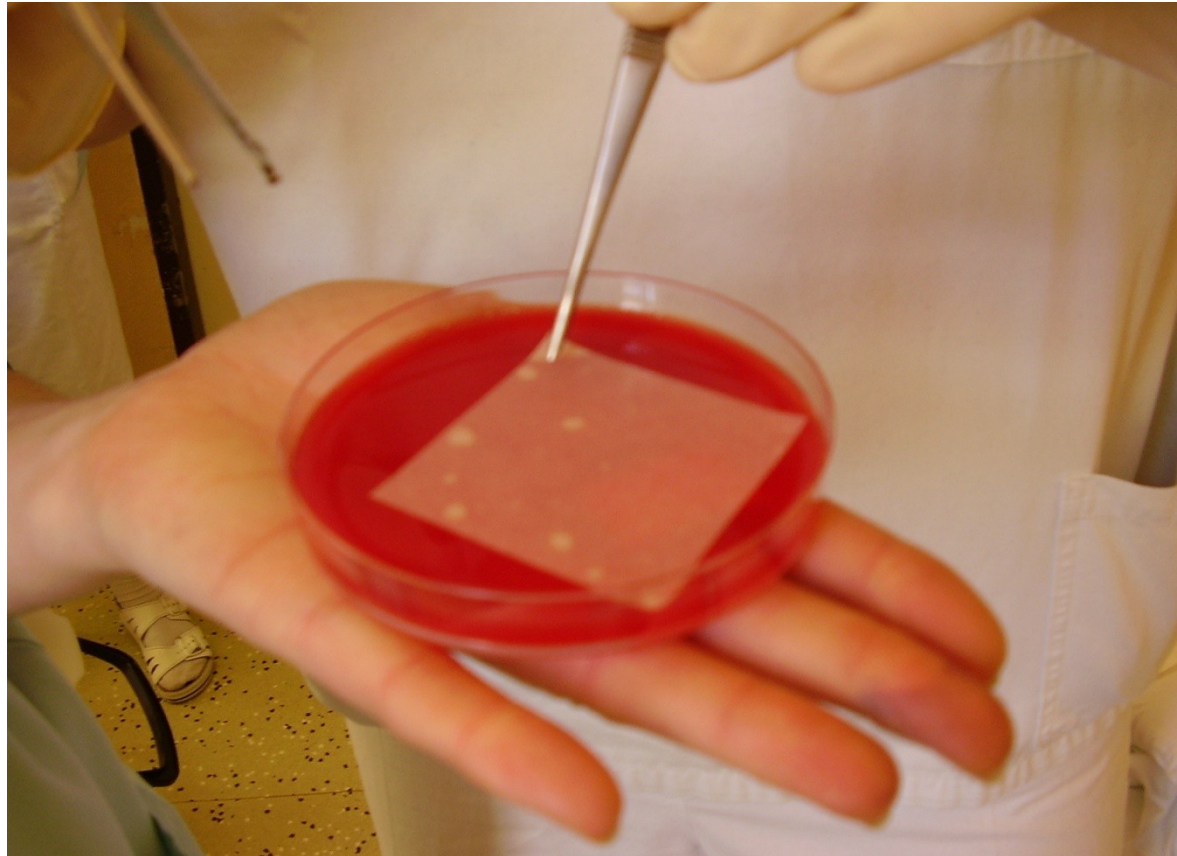


mekalasi.fi

# Odběry u povrchových ran

- **klasická metoda: stěr** odběrovou soupravou s transportní půdou (**kvalitativní**)
  - odebírat tak, aby byl zachycen předpokládaný patogen (je potřeba se dostat až k ložisku infekce)
  - nekontaminovat vzorek okolní mikroflórou, zejména z kůže
- **otisková metoda:**
  - na ránu plošného charakteru (např. diabetický vřed) přiložit čtvereček sterilní gázy
  - přenést na kultivační půdu (krevní agar)
  - v laboratoři se přenese i na další půdy
  - **semikvantitativní** vyhodnocení (počet/plocha)

## Úkol 2: Otisk – provedení



- chirurg obdrží sterilní kultivační půdu a čtvereček o rozměrech 25 cm<sup>2</sup>

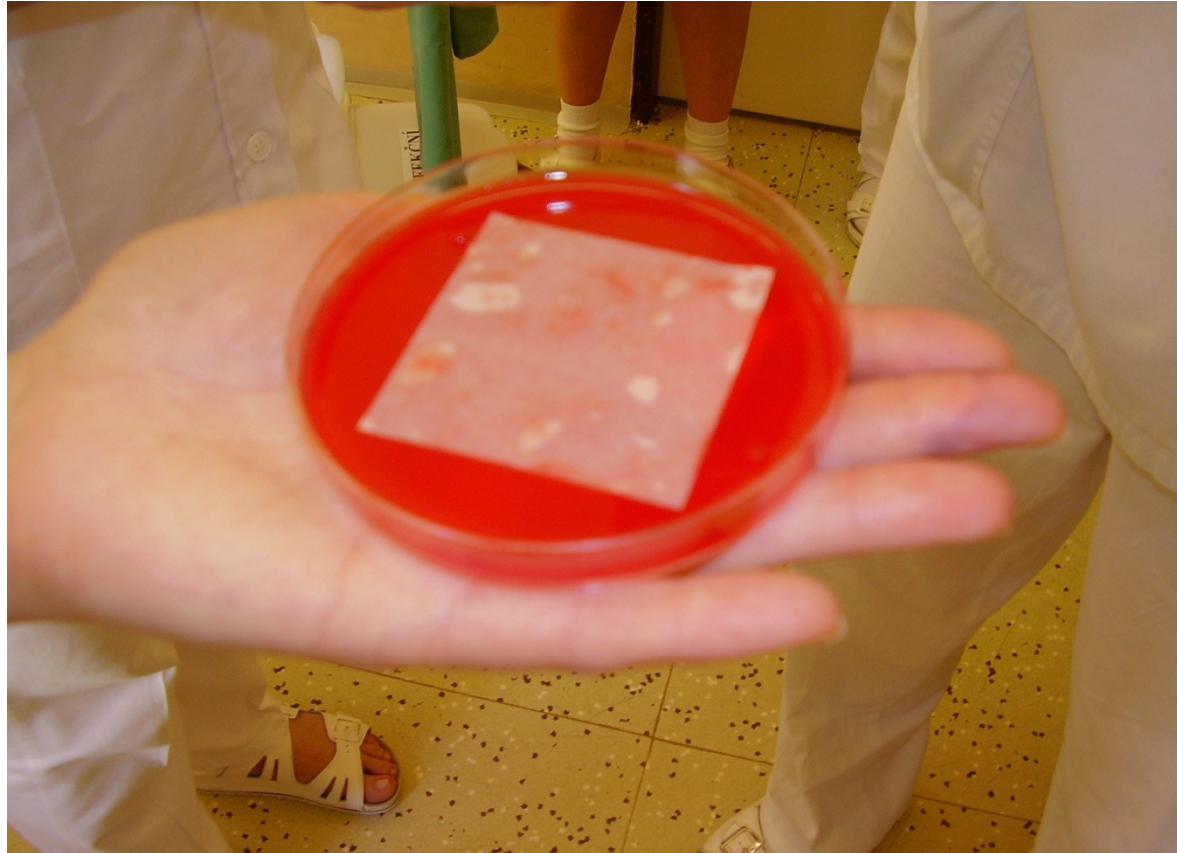
## Úkol 2: Otisk – provedení (2)



- chirurg nebo sestra přemístí čtvereček do rány tak, aby se všude dotýkal (ponechá ho tak 10 sekund až minutu)



## Úkol 2: Otisk – provedení (3)



- čtvereček se přemístí zpět na půdu

## Úkol 2: Otisk – vyhodnocení

- v laboratoři je filtrační papír s otiskem umístěn na dvě nebo tři další kultivační půdy
- vyhodnocení po 24 hodinách
- určují se mikroby (zejména s využitím média URI)
- kromě identifikace kolonií také kvantifikace (počet CFU/25 cm<sup>2</sup>)

# Diagnostika infekcí ran

- **výtěry:**
  - v ráně **není žádná „běžná flóra“**
  - využíváme větší množství půd (odhalení širší škály patogenů)
    - **KA, ENDO, KA s NaCl** (stafylokoky), **KA s amikacinem** (streptokoky a enterokoky)
    - pomnožovací **tekuté půdy** (v ráně může být jen menší množství mikrobů)
- **tekuté vzorky:**
  - **mikroskopie** (mikroby, množství leukocytů apod.)
  - pomnožovací **tekuté půdy, selektivní půdy**



# Výtěr z rány: diagnostické schéma

- podle okolností se může v praxi lišit
- **Den 0:** pouze nasazení kultivací
- **Den 1:** výsledek primokultivace vzorku na KA, Endo, KA s 10 % NaCl a KA s amikacinem
  - v případě negativity všech pevných půd se prohlíží bujón (je-li zakalený, vyočkuje se, tzv. subkultivace)
- **Den 2:** expedice všech negativních a mnohých pozitivních výsledků – pro komplikace, rezistence apod. zdaleka ne všech
- **Den 3:** expedice dalších pozitivních výsledků

# Výtěr z rány: interpretace

- **běžná flóra:** žádná **není** (vše se považuje za možného patogena)
- **patogena je v podstatě jakákoli bakterie nebo kvasinka** (výjimka koagulázanegativní stafylokoky a korynebakteria u povrchových kožních ran)
- **kolonizace:** u povrchových ran může jít o kolonizaci (hlavně pseudomonáda a proteus)
  - **kritická kolonizace: rána**, která **se nehojí** z důvodu mikrobiálního množení, zároveň však **bez napadení tkáně** nebo zjevné imunitní odpovědi pacienta
- laboratoř testuje **citlivost na ATB všech nálezů**

# Léčba hnisavých infekcí

- vždy **lokální ošetřování rány** (lokální aplikace různých preparátů, pravidelné čištění a převazování, podpora hojení, odstraňování nektróz – možností je zde i larvoterapie)
- nepředpokládáme-li anaeroby, je nejvhodnější **naslepo** k celkové léčbě **oxacilin** (klasické protistafylokokové antibiotikum)
- pravděpodobný **streptokokový** původce, lékem volby klasický **penicilin** ve vysokých dávkách
- u nemocničních nákaz nutná cílená léčba

# Úkol 3: Vyhodnocení kultivace z hlubší rány

- vyhodnoťte výsledky kultivace, vezměte v potaz anamnézu
- oxidázový test bude na bočním stole

# Přítomnost mikrobů v krvi

- přítomnost bakterií v krvi za normálních okolností přechodná (transientní bakteriémie např. při čištění zubů)
- infekce krevního řečiště (IKŘ) zpravidla pro **bakteriální**, případně **mykotické** (kvasinkové) infekce
- **bakteriémie: přítomnost bakterií v krvi** (bez dalšího hodnocení klinického významu)
- **virémie** (přítomnost virů v krvi): součástí různých virových onemocnění (zejména hepatitidy a HIV)
- **krevní paraziti**: malarická plasmodia, trypanosomy a filárie (vlasovci)

# Bakteriální infekce krevního řečiště

- bakteriémie jako spouštěcí mechanismus sepse
- produkty mikroorganismů interagují s IS → SIRS
- **SIRS** (syndrom systémové zánětlivé odpovědi)
  - zánětlivá odpověď organismu na infekční nebo neinfekční podnět
- **seps** = **SIRS + infekce**
  - primární (tyfus)
  - sekundární (katetrové, urosepse, abdominální seps)
  - subakutní bakteriální endokarditidy (*sepsis lenta*)

# Diagnostika sepse

- **komplexní vyšetření:**
  - **biochemická:** zánětlivé ukazatele (CRP, prokalcitonin, diferenciální krevní obraz) známky diseminované intravaskulární koagulopatie (trombocytopenie, snížení antitrombinu III, apod.)
  - **fyzikální:** RTG srdce a plic, ORL vyšetření, jícnový ultrazvuk (pro ložiska na srdci), CT
  - **neurologické**
  - **mikrobiologické**
    - **hemokultury** další mikrobiologický materiál (katetry, moč, sputum, lumbální punkce, atp.)

# Hemokultura – odběr krve

- hemokultura = kultivační vyšetření krve na přítomnost bakterií (kvasinek)
- **nesrážlivá (!) krev** (prokazujeme živé mikroby, nikoliv antigeny nebo protilátky jako v sérologii)
- odběr do speciálních lahviček s transportně-kultivačním médiem pro automatickou kultivaci
- nutno zabezpečit tak, aby se **minimalizovalo riziko pseudobakteriémie (falešně pozitivní výsledek)**
- u dospělých se odebírá 20 až 30 ml krve, u dětí zpravidla 1–5 ml podle věku (odběr náročnější než u dospělých, u dětí má význam i méně bakterií)
- **nutné vyznačit čas a místo odběru (!)**



# Úkol 4: druhy hemokultivačních nádobek

- různé typy podle toho, které mikroby mají být především zachyceny (aerobní, anaerobní, kvasinky)
- některé nádobky s aktivním uhlím (určeny zejména ke kultivaci krve pacientů, kterým jsou již nasazena ATB), aby se snížilo procento falešně negativních výsledků (ATB by potlačilo růst)
- **nejběžnější nádobky:**
  - **aerobní standardní**
  - **aerobní s aktivním uhlím**
  - **anaerobní s aktivním uhlím**
- **nutné vyznačit čas a místo odběru (!)**

# Příklady nádobek na hemokultivaci



BacT/ALERT



BACTEC

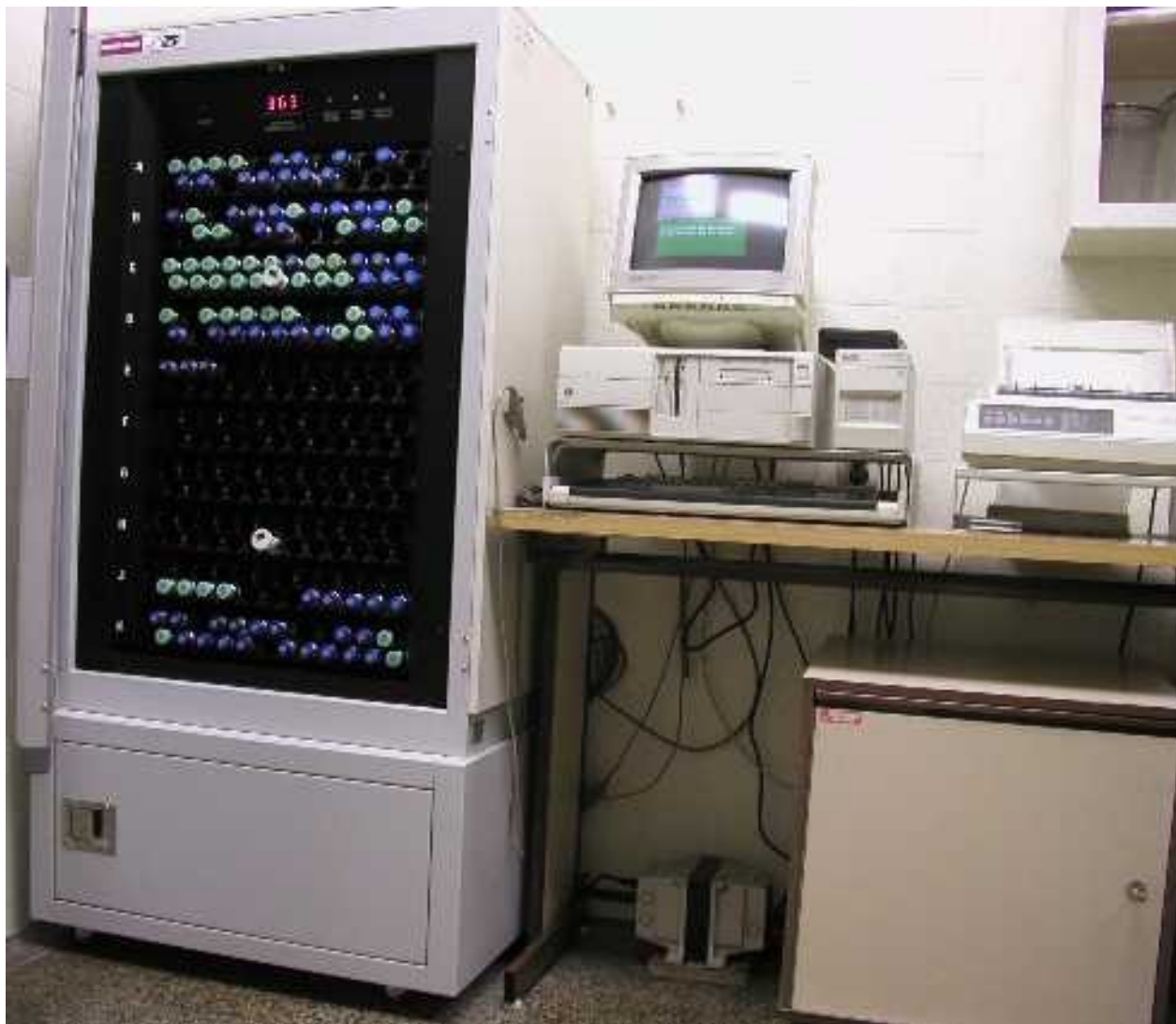
# Automatické kultivátory

- kultivátor napojený na počítač
- **automatický udržuje optimální podmínky kultivace**
- **vyhodnocuje stav nádoby** a indikuje případný růst (např. změna reflektance, tj. optických vlastností lahvičky)
- **růst je zvukově a opticky signalizován**
- pokud ani po týdnu nic neroste, signalizuje negativní výsledek

# Automat na hemokultury

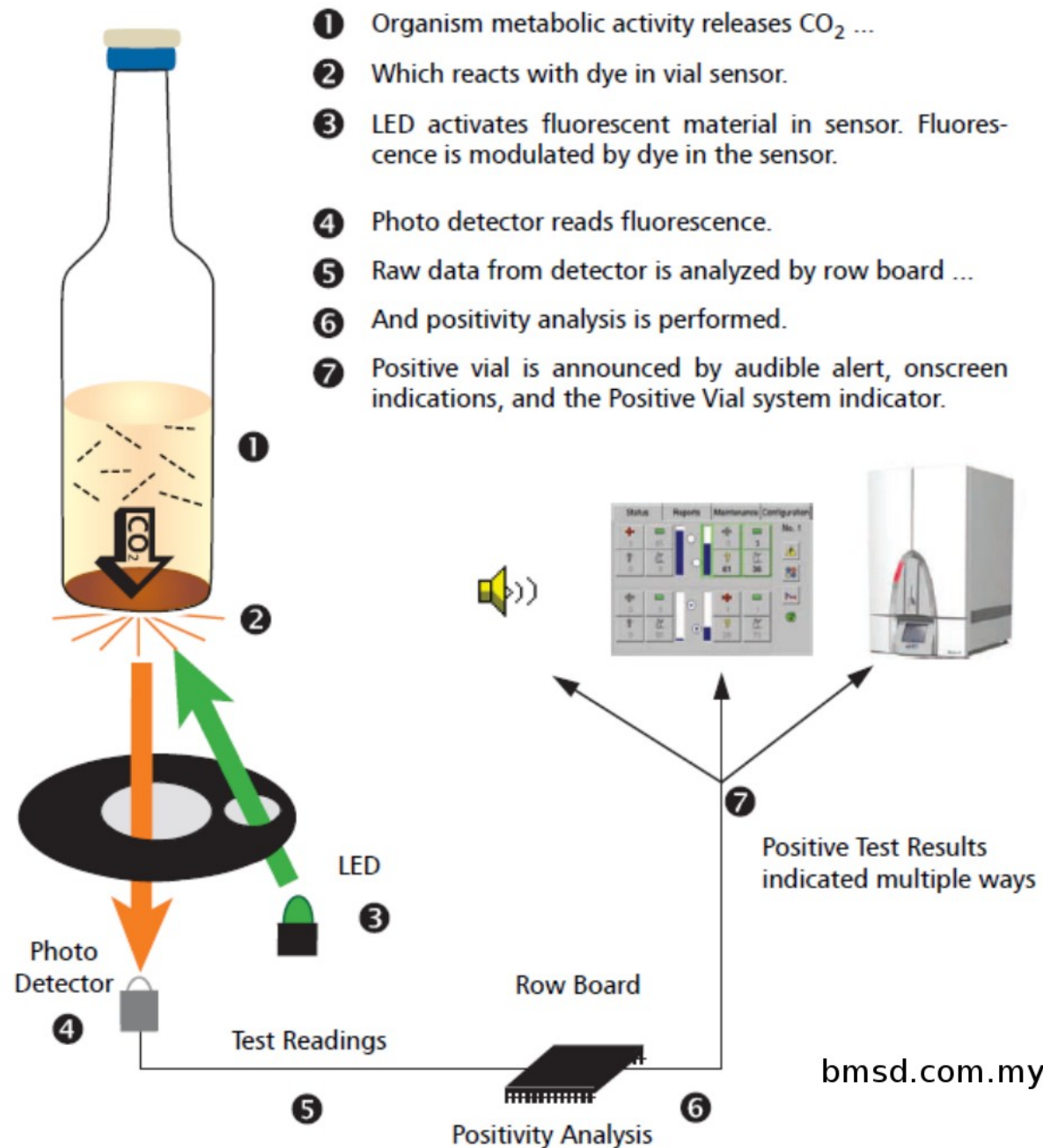


# Automat na hemokultury (2)





# Princip automatického kultivátoru BACTEC



# Pseudobakteriémie – příčiny

- pseudobakteriémie = falešně pozitivní výsledek
- **nevhodně provedený** odběr (nedodržení zásad asepse)
- **odběr pouze ze zavedených vstupů** (záchyt bakterií kolonizujících příslušný vstup – nemusí být skutečným původcem bakteriémie)
- **důsledek:** pacient je zbytečně **léčen pro neexistující infekci** nebo pro infekci jiným druhem mikroba → zastaveno hledání skutečného patogenu

# Kontaminace katetrů a implantátů

- při podezření na kontaminovaný cévní katetr se mění
- **starý katetr poslat bakteriologii**
- existují **metody schopné odhadnout**, zda jde o **skutečné osídlení katetru či náhodný nález**
- **platí pro jakékoli implantáty**, které se vyjímají z těla  
– jejich mikrobiologické vyšetření může přinést podstatnou **informaci pro další léčbu**



# Pseudobakteriémie – protiopatření

- **odebírat cíleně**, když je přítomnost bakterií v krvi pravděpodobná (neodebírat, když je indikováno jiné vyšetření)
- odebírat **v dostatečné kvantitě**: jedna hemokultura nemá dg. význam, dvě mají malý význam, **tři jsou optimum**
- odebírat **z vhodných míst**: **nejméně jednu z nové venepunkce** (ideálně tři venepunkce a odběr z žilního katetru)
- odebírat **ve vhodnou chvíli**, u septických stavů typicky **při vzestupu teploty**
- **asepse + správná nádobka + správně vyplněná průvodka** (čas a místo odběru)

# Rozpoznání pseudobakteriémie

- typické znaky pseudobakteriémie (falešná pozitivita hemokultury)
  - **pozitivní jen některé** ze tří hemokultur
  - **pozitivní všechny**, ale z každé vyroste jiný kmen (různý vzhled kolonií na půdách, různá ATB citlivost) **za různě dlouhou dobu** (odpovídá různé kvantitě; normální rozmezí do 5–6 hodin)
  - klinické potíže pacienta neodpovídají nálezu
  - stejný kmen se najde i na kůži pacienta

# Posouzení času positivity

- **TTD = time to detection** (čas do positivity)
- čas od odběru do okamžiku, kdy automat hlásí pozitivitu
- kratší v případě masivní přítomnosti bakterií v krvi a delší tehdy, když je bakterií málo
- **u skutečných bakteriemií je čas většinou kratší** (do 48 hodin) a **u všech** odebraných hemokultur **přibližně stejný**
- může být kratší u hemokultury z místa, které je zdrojem infekce (například hemokultura z CVK, když tento CVK je zdrojem katetrové sepsy)
- **nelze vyhodnotit bez času a místa odběru (!)**

# Pozitivní hemokultura

- lahvička vyjmuta z přístroje
- **nutno zaevidovat čas**, resp. dobu od příjmu do positivity (čím delší doba, tím pravděpodobnější je kontaminace)
- **vyočkování** na pevné půdy a **nátěr** na sklo barvený Gramem
- **orientační diskový test citlivosti** na ATB podle výsledků Gramova barvení (místo standardní suspenze se použije přímo tekutina z lahvičky → pouze orientační výsledky)
- další den **vyšetření citlivosti na ATB kvantitativní metodou** (mikrodiluční test, už máme standardní inokulum)

# Úkol 5, 6 a 7: Hemokultury

- úkolu 5: prohlédněte si výsledek hemokultury v mikroskopu, popište bakterie (G+, G-, koky, tyčinky, popsat jejich uspořádání)
- úkolu 6: popište výsledky kultivačních testů, vyhodnoťte výsledky předběžného testu na ATB (kvantitativní testování citlivosti na ATB mikrodiluční metodou nebudeme ve cvičení provádět)
- úkol 7: pokuste se vhodně interpretovat vzorky hemokultur (soustředte se nejen na nalezený patogen, ale i na TTD a místo, kde byla krev odebrána)

# Úkol 7: Interpretace nálezů

- Jan Bílý:
  - odebraly se tři hemokultury, všechny jsou pozitivní, všechny po zhruba stejném čase po odběru (10/13/13,5 h), kmeny vypadají podobně, je pravděpodobné, že nález je skutečným patogenem
  - vzorek krve s kratším časem (10 h) byl odebrán z centrálního žilního katetru – to by nás mohlo vést k domněnce, že právě tento katetr je zdrojem infekce

# Úkol 7: Interpretace nálezů (2)

- Jakub Černý:
  - odebraly se tři hemokultury, všechny jsou pozitivní, avšak jedna po 8 hodinách, druhá po 26 hodinách a třetí po 38 hodinách
  - kmeny jsou fenotypově odlišné (včetně různých antibiogramů), dokonce patří k různým druhům stafylokoka, je velmi pravděpodobné, že jde o kožní kontaminanty

# Průkaz mikrobů kolonizujících katetry

- **kvalitativní pomnožení v bujonu:**
  - **citlivé** (prakticky 100%), ale **nelze rozlišit kolonizaci od kontaminace** (proto se metoda nedoporučuje)
  - negativní výsledek vylučuje kontaminaci
- **semikvantitativní metoda (Makiho metoda):**
  - katetr je válen po povrchu agaru sterilní pinzetou
  - **pro krátce zavedené katetry** (vnější kolonizace)
  - pro déle zavedené katetry není vhodná (kolonizovány zevnitř → falešně negativní výsledky)
  - kolonizace při >15 koloniích



# Průkaz mikrobů kolonizujících katetry (2)

- **sonifikační metoda:**

- katetry sonifikovány v ultrazvukové vaně
- uvolněné bakterie kvantifikovány vyočkováním na KA, zjišťuje se počet CFU
- hranice positivity:  $>100$  (1000) CFU

# Eradikace biofilmů, citlivost k ATB

- **ATB léčba často potlačí pouze symptomy infekce** způsobené buňkami uvolněnými z matrix biofilmu
- buňky uložené v **matrix biofilmu není schopna zasáhnout**
- k eradikaci biofilmu je možno využít vysokých koncentrací ATB či jejich kombinací (např. ATB zátka katétru), pokud léčba selhává, je nutno vyjmout ložisko biofilmu
- **hodnoty MBEC leží často nad break pointem** pro daná antibiotika (tzn. bakterie jsou k nim rezistentní)
- hodnoty **MBEC zpravidla několikanásobně vyšší než MIC**

# Úkol 8: průkaz mikrobů kolonizujících katetry

- porovnejte jednotlivé metody a rozhodněte o možné kolonizaci katetru
- kvalitativní metoda
- semikvantitativní metoda ( >15 CFU)
- sonifikace katetru (>100 CFU)

# Úkol 9: Citlivost biofilm pozitivních mikrobů k ATB

- zákal/žluté dŮlky znamenají růst mikrobů
- odečtěte hodnoty MIC (planktonická forma) a MBEC (biofilm)
- porovnejte hodnoty mezi sebou



# Po tomto cvičení byste měli umět:

- vysvětlit diagnostické postupy infekcí ran a krevního řečiště, vč. správného odběru materiálu
- vysvětlit postup při kultivaci hemokultur, vysvětlit detailně pojem pseudobakteriémie
- popsat možnosti zpracování kolonizovaného katetru
- porovnat hodnoty MIC a MBEC pro planktonickou formu bakterií resp. pro biofilm, vysvětlit důsledky pro léčbu