

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*, β -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 anaerobních 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:**

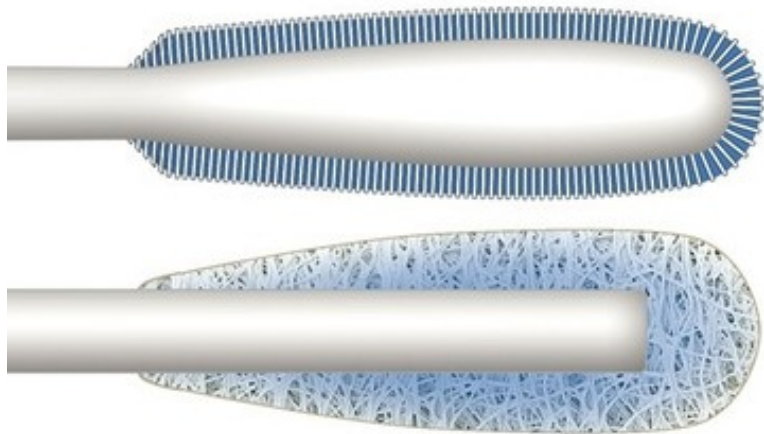
- není-li možno poslat tekutinu (je nedostatek tekutiny), bezpodmínečně nutné **použití soupravy s transportní půdou**
- v poslední době tzv. **E-swaby**
- v některých případech je také **vhodný nátěr**, případně **otisk** tkáně na sklíčko (zachytí se i patogeny, které se nepodařilo vypěstovat)
- v zvláště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

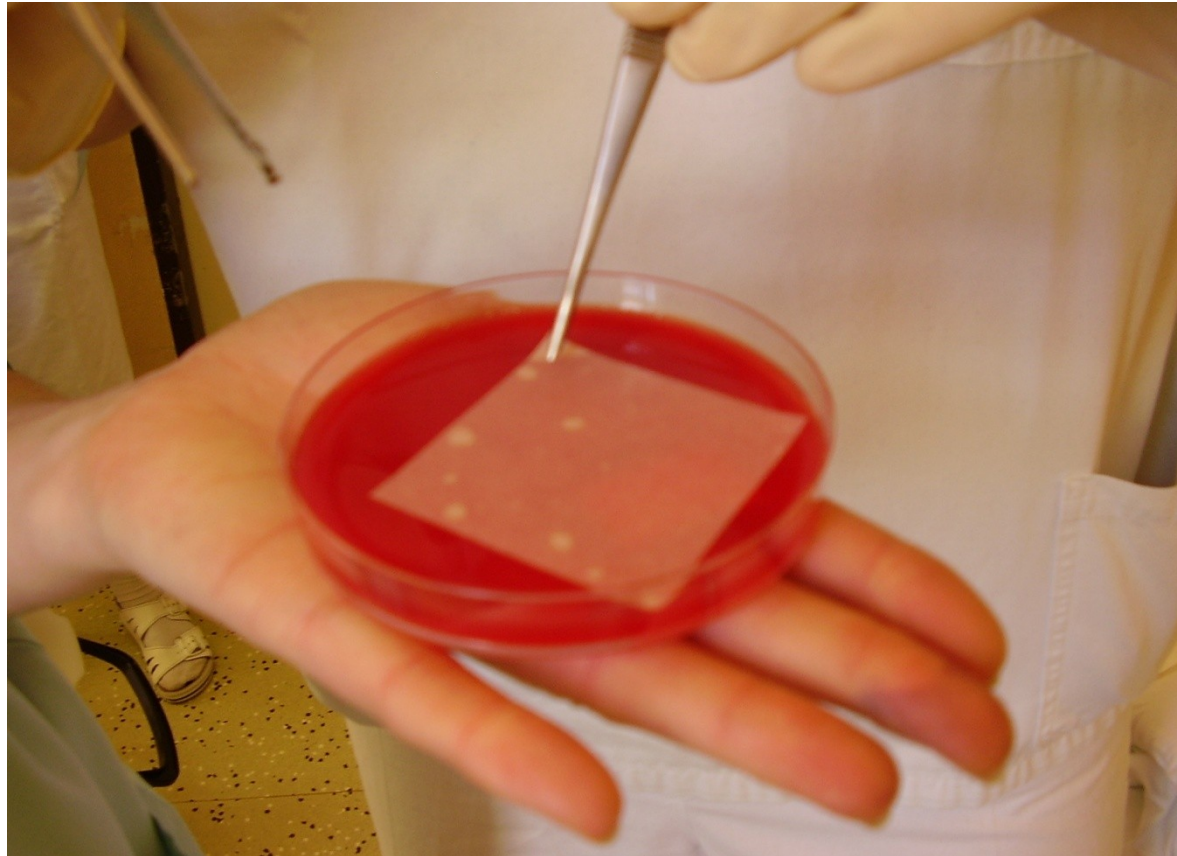


mekalasi.fi

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



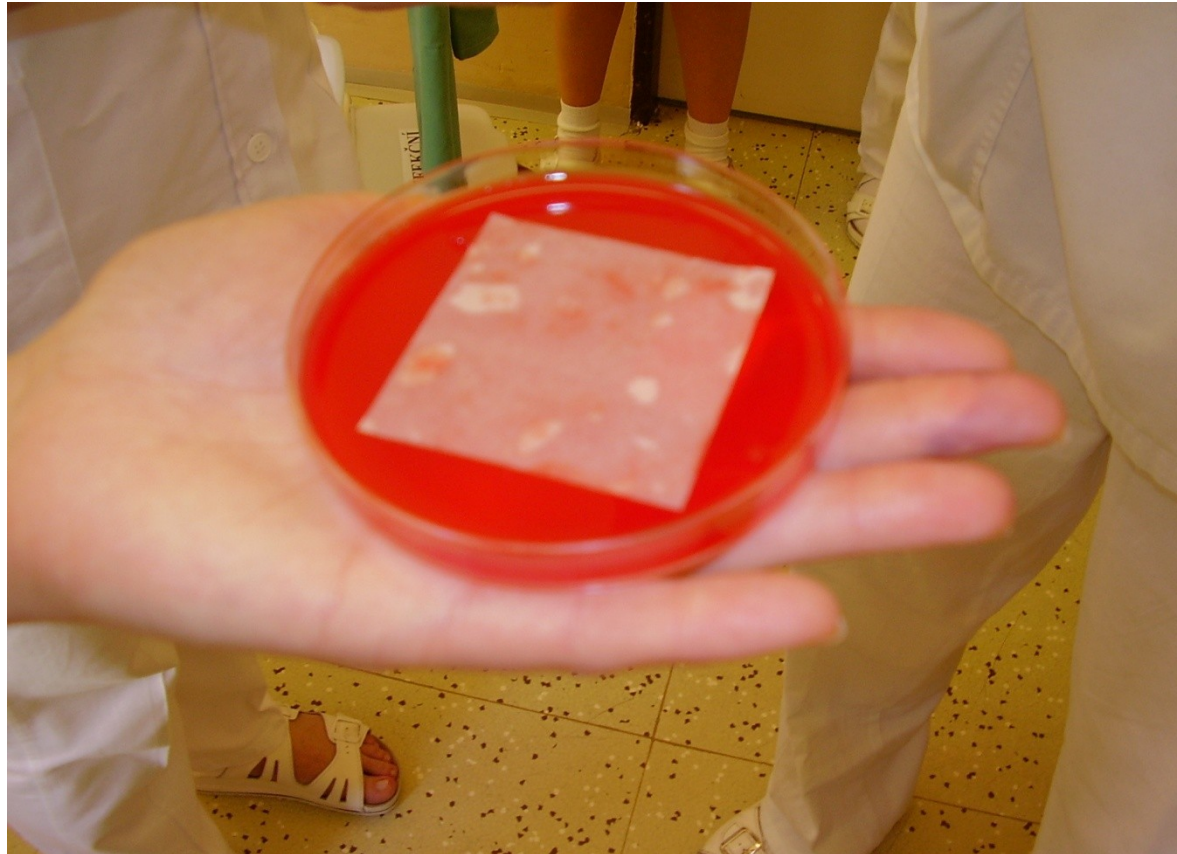
- chirurg obdrží sterilní kultivační půdu a čtvereček o rozměrech 25 cm²

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 cm²)

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, uroseps, 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

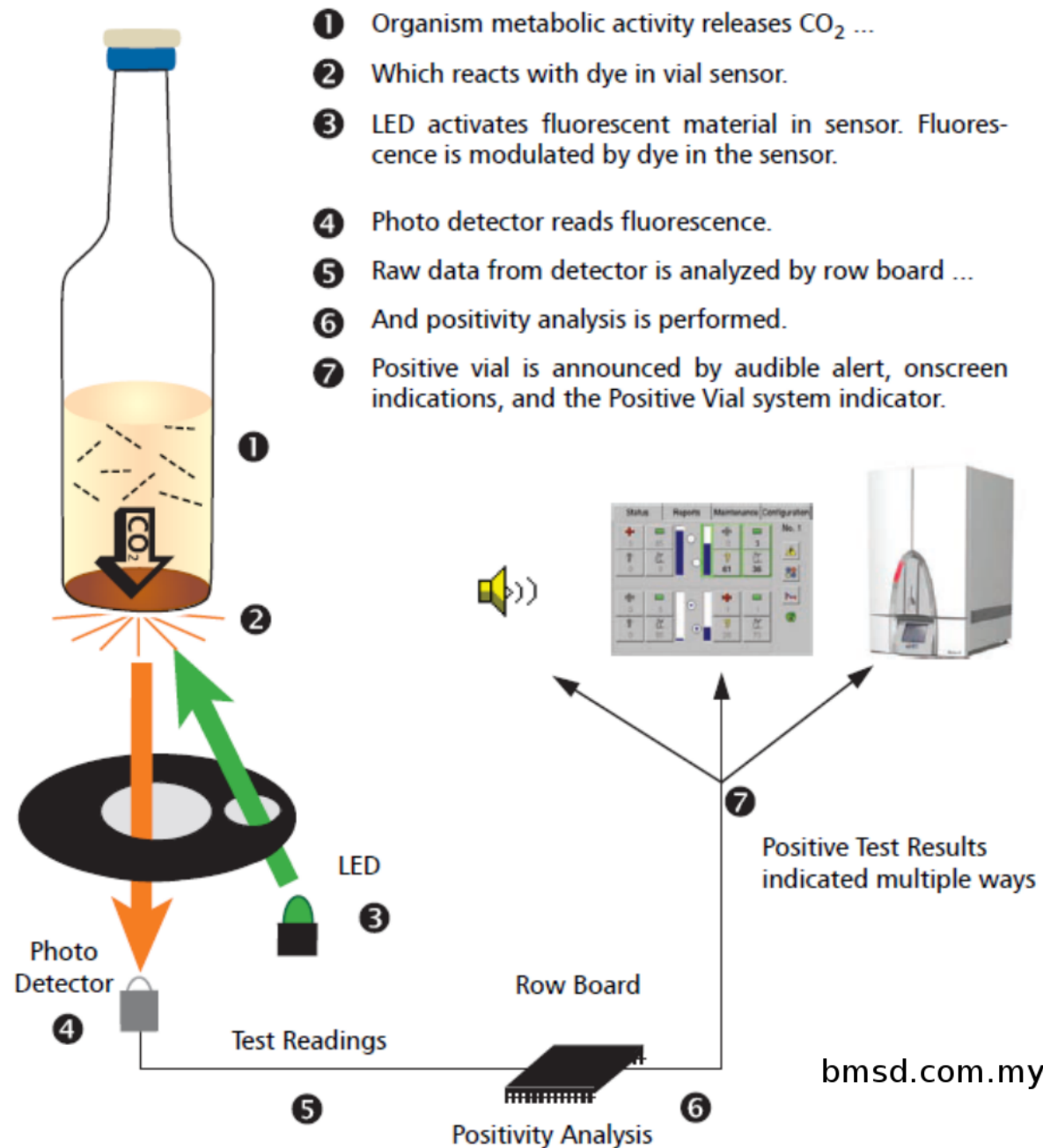
Automat na hemokultury



Automat na hemokultury (2)



Princip automatického kultivátoru BACTEC



bmsd.com.my

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 nálezů
 - 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 sepse)
- **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

- **úkol 5:** prohlédněte si **výsledek hemokultury** v mikroskopu, popište bakterie (G+, G-, koky, tyčinky, popsat jejich uspořádání)
- **úkol 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** (soustřeďte 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

Úkol 8: průkaz mikrobů kolonizujících katetry

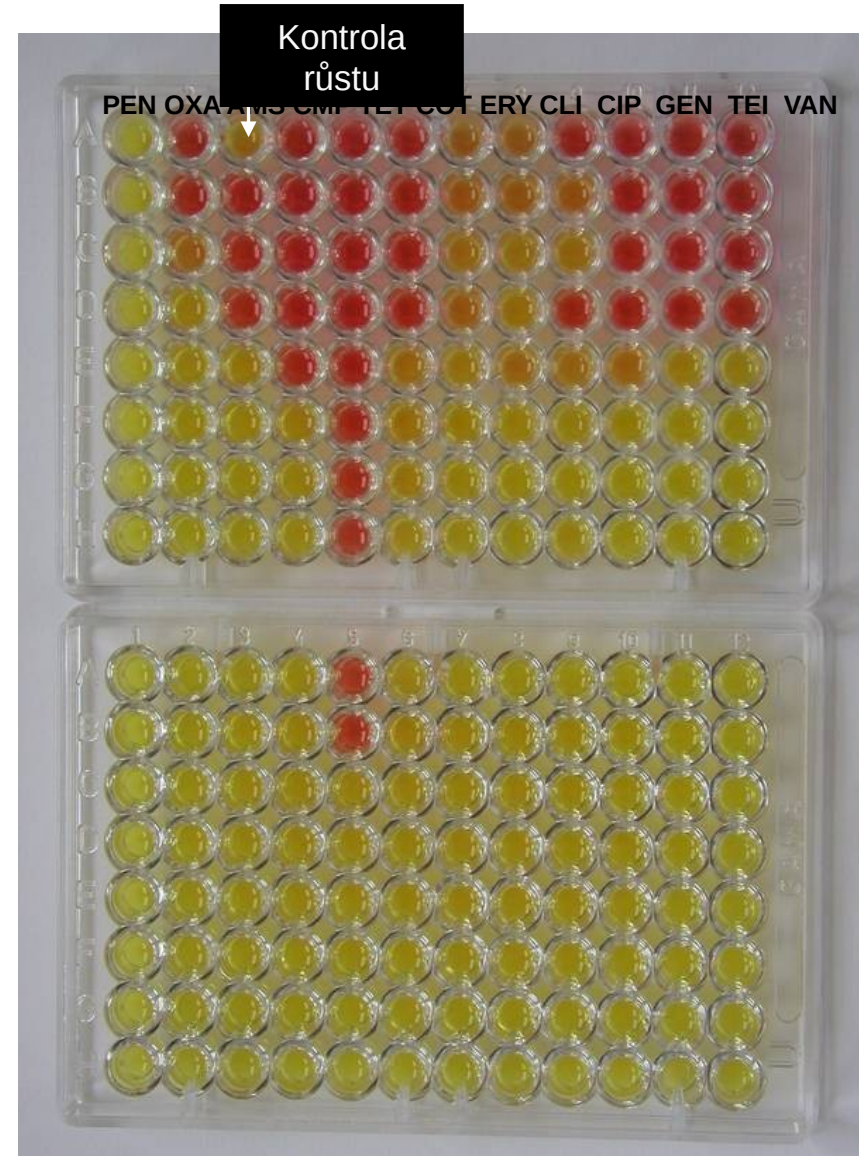
- porovnejte jednotlivé metody a rozhodněte o možné kolonizaci katetru
- kvalitativní metoda
- semikvantitativní metoda (>15 CFU)
- sonifikace katetru (>100 CFU)

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 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