

Mikrobiologická diagnostika infekcí CŽK

Otázky spojené s diagnostikou katéetrových sepsí

Filip Růžička

Mikrobiologický ústav
Lékařské fakulty Masarykovy univerzity
a
Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno



XXIV. mezinárodní konference
NEMOCNIČNÍ EPIDEMIOLOGIE A HYGIENA
16. - 17. 5. 2017 Brno

Hemokultury – rychlost + citlivost + spolehlivost

Kultivace (až 7 dní)



Mikroskopie
(15 min)



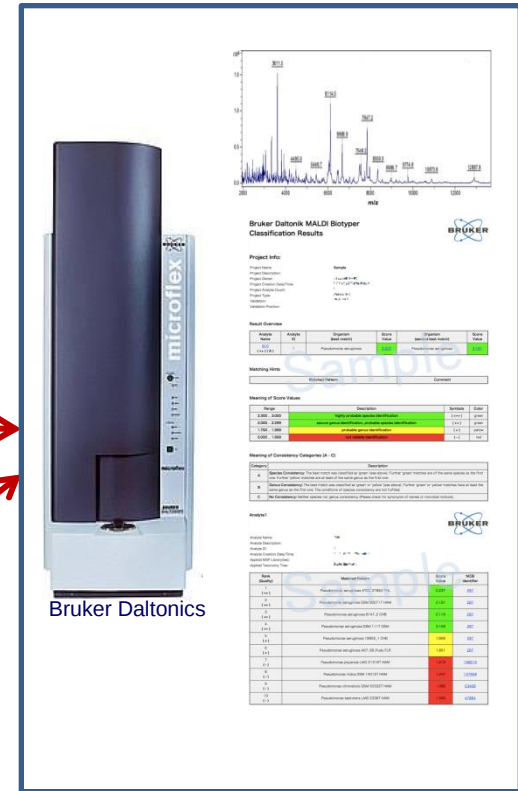
Identifikace
(60 min.)



Kultivace
(24–48 hod.)



Identifikace
(15–60 min)



„Genetika“ (cca 3–7 hod.)

PCR – kvantifikace
Broad range PCR assay
FISH (*Fluorescent in situ hybridisation*)
aj.

Identifikace (hodiny-dny)

Identifikace (hodiny-dny)

Sekvenace
PCR identifikace
Typizace (MLAST, PFGE aj.)
aj.

Identifikace
(5h) 24–48 h



Laboratorní diagnostika infekcí CŽK spojených s tvorbou biofilmu

(katéetrové infekce krevního řečiště)

Pevné přilnutí k povrchu - ↓ záchytu mikroba.

Forma biofilmu?

Role v patogenezi a vliv na terapii?

Průkaz kolonizace implantátu



Průkaz schopnosti tvořit biofilm



Účinnost antimikrobiální terapie na biofilm

- **Katétrová infekce krevního řečiště (catheter-related bloodstream infection)**
 - Bakteriémie či fungémie + průkaz kolonizace katétru
 - Klinická manifestace infekce
 - Nепrokázán jiný zdroj infekce
 - **Kolonizace katétru** – nález signifikantního množství agens, bez klinických příznaků
 - **Katétrová infekce možná (catheter-associated infection)** – epidemiol. pojem
primární inf. krevního řečiště + zavedený katétr (> 48 hod) + neprokázán jiný zdroj
 - **Lokální infekce katétru** - infekce v místě inzerce katétru, infekce tunelu či kapsy, flebitida
- (Doporučení CDC – O'Grady 2002; Tomlinson 2011)

	Francie	Německo	Itálie
Počet obyvatel	60,2	82,5	57,5
Implant. CVK (mil.)	1	1,75	0,49
Incidence CRBSI (1000 „katétrdní“)	1,23	1,5	2,0
CRBSI za rok	14 400	8 400	8 500
Finanční zátěž (mil. EUR/rok)	100 – 130	59 – 78	81

U všech uvedených zemí data z národních systémů surveillance nozokomiálních infekcí

(Tacconelli et al., 2009)

A) Průkaz kolonizace katétru – katétr *in situ*

- Kvantifikace hemokultur

Kvantita mikrobů ve vzorku z katétru (každé lumen)

Pozitivita >100 CFU/ml (Capdevila 1992)

Porovnání kvantity mikrobů ve vzorcích z periferie a z katétru

Pozitivita $\geq 1:3 - 5$ (10) (Fan 1989)

- Rozdíl doby positivity u hemokultur odebraných z katétru a periferie

Pozitivita >2 h (Blot 1999) (>6 hod u *C. glabrata*)

- Intraluminární brush

Pozitivita ≥ 100 CFU/ml, ↑ citlivost ✗ riziko disseminace
(Kite 1997)

- AOLC (Akridine Orange Leukocyte Cytospin)

rychlá metoda (Rushforth 1993)

+ Gramovo barvení – ↑ citlivost (Kite 1999)

B) Průkaz kolonizace katétru – katétr vyjmut

~~- Subkultura + následné vyočkování~~ ↑ citlivost × ↓ ↓ ↓ specifita

- Semikvantitativní metoda

Pozitivita > 15 CFU/katétr (4x rolování katétru po agaru)

Levná, jednoduchá × nezachytí intraluminární kolonizaci

(Maki et al., 1977)

- Intraluminální proplach – flush

Pozitivita > 10^3 CFU/katétr (Cleri et al., 1980)

- Sonifikace , vortexování – vhodná kombinace

Pozitivita > 10^3 CFU/katétr (Brun et al., 1987, Sherertz et al., 1990)

- Barvení katétru – Gram nebo akridinová oranž

Nepraktické, ne pro všechny katetry

(Cooper et Hopkins, 1985; Spencer et Kristinsson, 1986)

Výběr sonikátoru

Velikost vany (v litrech) – efektivní využití účinků UZ = $m_{\text{předmětu}} < \frac{1}{2} m_{\text{lázně}}$

Akustický výkon generátoru – energie vyslaná zdrojem za urč.dobu (Watt = J/s)

Objemová hustota výkonu (W/litr) – ↑ výkon - intenzivnější účinky UZ

(Intenzita UZ pole: $0.22 \pm 0.05 \text{ W/cm}^2$)

Pracovní kmitočet UZ: obvykle 20-25kHz, **40**-50kHz nebo 70kHz.

- nižší kmitočet má vyšší erozivní účinky a je méně absorbován
- vyšší kmitočty lépe pronikají i do nejmenších otvorů a spár.

Obsah rozpuštěných plynů v médiu: ↓ - kavitační účinky (plyn je více stlačitelný)

Režim degas/odplynění či chod zařízení naprázdno (desítky min.)

Možnost nastavení

Cena



Detection of Prosthetic Hip Infection at Revision Arthroplasty by Immunofluorescence Microscopy and PCR Amplification of the Bacterial 16S rRNA Gene

MICHAEL M. TUNNEY,¹ SHEILA PATRICK,^{1*} MARTIN D. CURRAN,³ GORDON RAMAGE,¹
DONNA HANNA,¹ JAMES R. NIXON,⁴ SEAN P. GORMAN,² RICHARD I. DAVIS,⁵
AND NEIL ANDERSON⁵

Department of Microbiology and Immunobiology, School of Clinical Medicine, The Queen's University of Belfast, Belfast BT12 6BQ, Northern Ireland; ²Department of Orthopaedic Surgery, Mater Hospital, Dublin, Ireland; ³Withers College, University of York, York, England; ⁴Department of Orthopaedic Surgery, Royal Free Hospital, London, England; and ⁵Department of Orthopaedic Surgery, Royal Free Hospital, London, England

processing. Bacteria growing within adherent biofilms on the surface of the prostheses were dislodged by mild ultrasonication (5 min, 50 Hz) into Ringer's



Journal of Orthopaedic Research 22 (2004) 39–43

Journal of
Orthopaedic
Research

www.elsevier.com/locate/orthres

Adhesion of *Staphylococcus* to orthopaedic metals, an in vivo study ☆

E. Sheehan ^{a,*}, J. McKenna ^a, K.J. Mulhall ^a, P. Marks ^b, D. McCormack ^{a,c}

^a Orthopaedic Infection Research Center, Cappagh National Orthopaedic Hospital, Dublin, Ireland

^b Department of Bioresearch, Trinity College, Dublin, Ireland

^c Department of Orthopaedic Surgery, Mater Hospital, Dublin, Ireland

Received 11 February 2003; accepted 11 February 2003

Biofilms were analysed by sonication at 50 Hz for 7 min, log reduction and subsequent Columbia blood agar plating, as described by Tunney et al. [21]. Results were expressed in colony-forming units

Research article

Open Access

Identification of bacteria on the surface of clinically infected and non-infected prosthetic hip joints removed during revision arthroplasties by 16S rRNA gene sequencing and by microbiological culture

Kate E Dempsey¹, Marcello P Riggio¹, Alan Lennon¹, Victoria E Hannah¹, Gordon Ramage¹, David Allan² and Jeremy Bagg¹

¹Infection and Immunity Research Group, Level 9, Glasgow Dental Hospital & School, 378, Glasgow G3 7LN, Scotland, UK
²The Queen Elizabeth National Spinal Injuries Unit, Scotland, South Glasgow University, Glasgow G51 4TF, UK

Corresponding author: Marcello P Riggio, m.riggio@dental.gla.ac.uk

Received: 28 Nov 2006 Accepted: 14 May 2007 Published: 14 May 2007

Arthritis Research & Therapy 2007, 9:R46 (doi:10.1186/ar2201)
This article is online at: <http://arthritis-research.com/content/9/3/R46>

ment, respectively. The sealed bags were then put into the sonicating water bath for 5 minutes at 350 Hz. This process has previously been shown not to affect bacterial viability negatively [10]. Sonicate (10 ml) from each component was pooled

Detection of Prosthetic Hip Infection at Revision Arthroplasty by Immunofluorescence Microscopy and PCR Amplification of the Bacterial 16S rRNA Gene

MICHAEL M. TUNNEY,¹ SHEILA PATRICK,^{1*} MARTIN D. CURRAN,³ GORDON RAMAGE,¹
DONNA HANNA,¹ JAMES R. NIXON,⁴ SEAN P. GORMAN,² RICHARD I. DAVIS,⁵
AND NEIL ANDERSON⁵

Department of Microbiology and Immunobiology, School of Clinical Medicine, The Queen's University of Belfast,
Belfast BT12 6BB,
²TTS,³ Withers O,
University
and

processing. Bacteria growing within adherent biofilms on the surface of the prostheses were dislodged by mild ultrasonication (5 min, 50 Hz) into Ringer's



Journal of Orthopaedic Research 22 (2004) 39–43

Journal of
Orthopaedic
Research

www.elsevier.com/locate/orthres

Adhesion of *Staphylococcus* to orthopaedic metals, an in vivo study ☆

E. Sheehan ^{a,*}, J. McKenna ^a, K.J. Mulhall ^a, P. Marks ^b, D. McCormack ^{a,c}

^a Orthopaedic Infection Research Center, Cappagh National O

^b Department of Bioresources, Trinity Colle

^c Department of Orthopaedic Surgery, Mater H

Received 11 February 2003; accepted

Biofilms were analysed by sonication at 50 Hz for 7 min, log reduction and subsequent Columbia blood agar plating, as described by Tunney et al. [21]. Results were expressed in colony-forming units

Research article

Identification of bacteria on the surface of clinically infected and non-infected prosthetic hip joints removed during revision arthroplasties by 16S rRNA gene sequencing and by microbiological culture

Kate E Dempsey¹, Marcello P Riggio¹, Alan Lennon¹, Victoria E Hannah¹, Gordon Ramage¹,
David Allan² and Jeremy Bagg¹

¹Infection and Immunity Research Group, Level 9, Glasgow Dental Hospital & School, 3
²The Queen Elizabeth National Spinal Injuries Unit, Scotland, South Glasgow University
Road, Glasgow G51 4TF, UK

Corresponding author: Marcello P Riggio, m.riggio@dental.gla.ac.uk

Received: 28 Nov 2006 Accepted: 14 May 2007 Published: 14 May 2007

Arthritis Research & Therapy 2007, 9:R46 (doi:10.1186/ar2201)

This article is online at: <http://arthritis-research.com/content/9/3/R46>

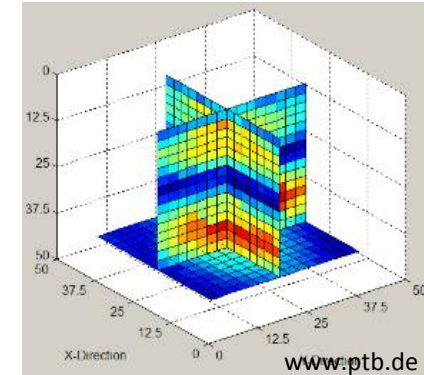
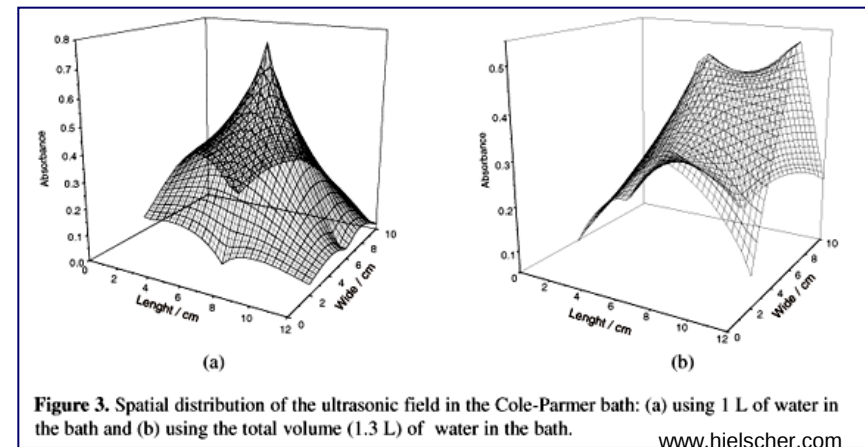
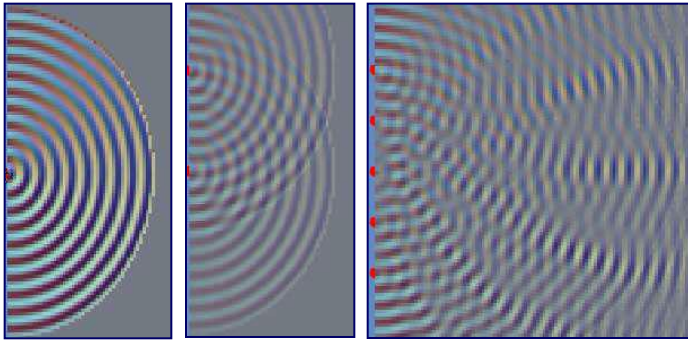
Open Access

nent, respectively. The sealed bags were then put into the sonicating water bath for 5 minutes at 350 Hz. This process has previously been shown not to affect bacterial viability negatively [10]. Sonicate (10 ml) from each component was pooled

Standardizace sonikace

**nehomogenní UZ pole
ve vaně sonikátoru**

Interference



Odraz λ ultrazvuku $\ll \lambda$ slyšitelného zvuku

UZ je proto: ↓ **pohlcování kapalinami a pevnými látkami překážek**
↑ pohlcení plynným prostředím
↓ ohyb ale ↑ **odraz od překážek**

Vliv sonikační nádoby a dalších předmětů v UZ lázni (stojan, vzorek aj.)

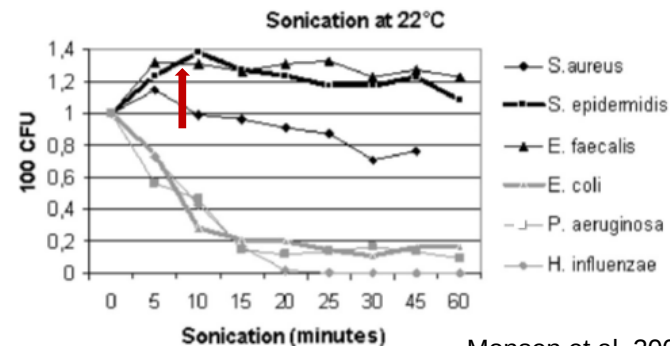
Standardizace metodiky ???

Kontrola mikrobicidního efektu

5 ml mikrobiální suspenze (0,5 McF)

sonikace → ředění, vyočkování → CFU

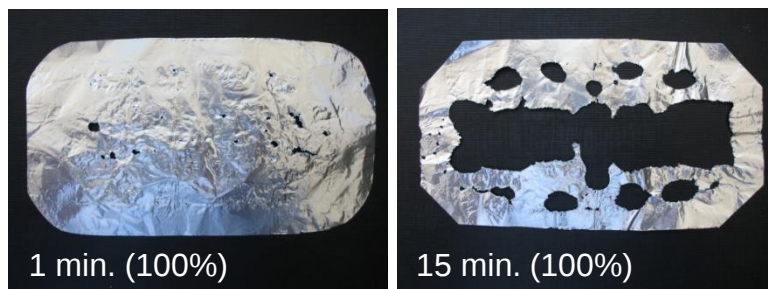
- *S. epidermidis* (CCM 7221)
- ***E. coli* (CCM 8320)**
- *C. albicans* (CCM 8320)
- *S. mutans* (CCM 7409)
- *P. acnes* (CCM 3343)



Monsen et al. 2009

Kontrola intenzity a homogenity UZ pole

- **Foil Test** (např. www.bandelin.com)



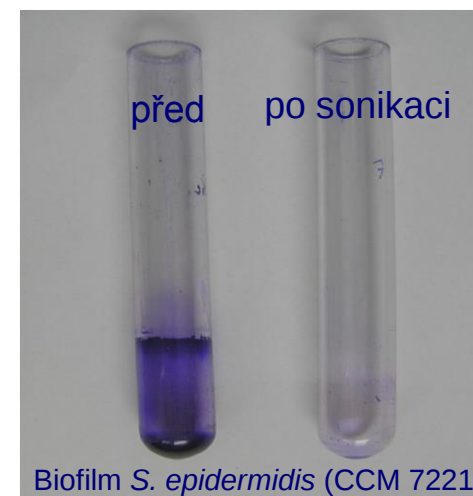
- **Hydrofon**



- **Sono-chemické reakce (Sonocheck)**



- **Test odstranění BF**



Kvantitativní vyšetření katétrů (sonikace + vortexování)

- Nádoba (sterilní) + Ringerův roztok (implantát pod hladinou) při 22°C
- Vortex (min. 30 s).
- Sonikace 3 min. (100%) v sonikátoru naplněného destilovanou vodou
- Vortexování (30 s)
- Sonikace 3 min. (100%) v sonikátoru naplněného destilovanou vodou
- Vortexování (30 s)



- sonikát na vhodné půdy
- Půdy se kultivují dále běžným způsobem
- V případě růstu mikrobů bakterie se počítá CFU/mL
→ CFU/implantát

+

- Případné využití mol-biol. metod (PCR, PCR 16S rRNA – sekvenování, aj.)



Klinický význam průkazu tvorby biofilmu

Marker klinické významnosti kmene

Je kmen izolovaný z hemokultur klinicky relevantní?
Nejde o kontaminaci?

Průkaz tvorby biofilmu může přinést cenné klinické informace

Prognóza. Jak postupovat v další léčbě?

Citlivost biofilmu k antimikrobiálním látkám

Volba terapeutické strategie.
Jaké antimikrobiální látky použít na katéetrovou infekci?

Průkaz tvorby biofilmu

Modifikace Christensenovy metody (Christensen et al., 1982, 1985)

Mikrodestičková metoda

Kultivační povrch: mikrotitr. destička

Zkumavková metoda

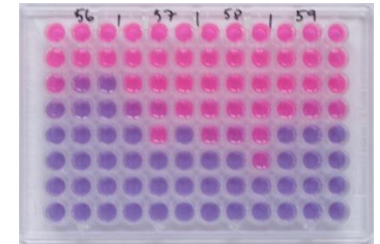
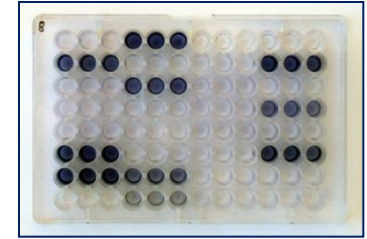
- Kvantifikace pomocí krystalové violeti (CV)

- Výplach + fixace sušením
- Obarvení roztokem barviva (krystal. violet) na 20 min.
- Oplach a eluce v 33% ledové kys. octové / etanolu
- Množství eluovaného barviva měřeno spektrofotometricky ($\lambda = 595 \text{ nm}$)

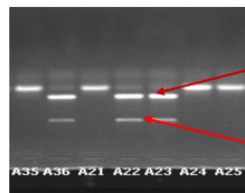
- Kvantifikace biofilmu pomocí redukce substrátu

- XTT, 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide;
- Alamar blue etc.

- Zjištění počtu CFU aj.



Genotypové metody



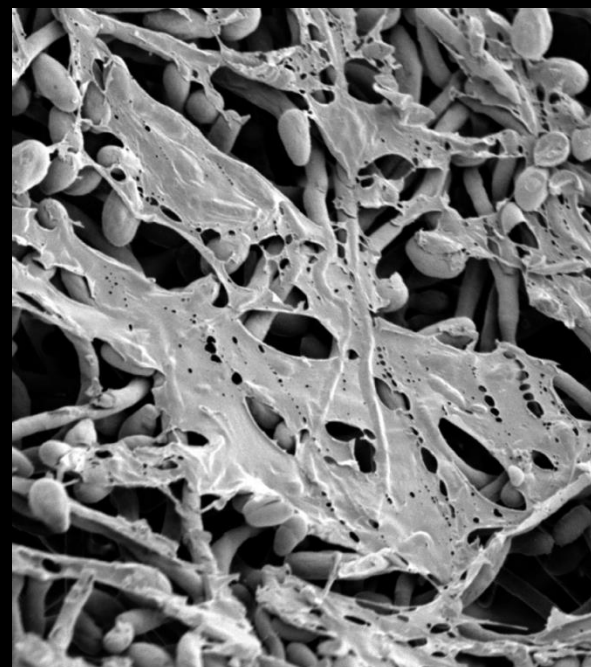
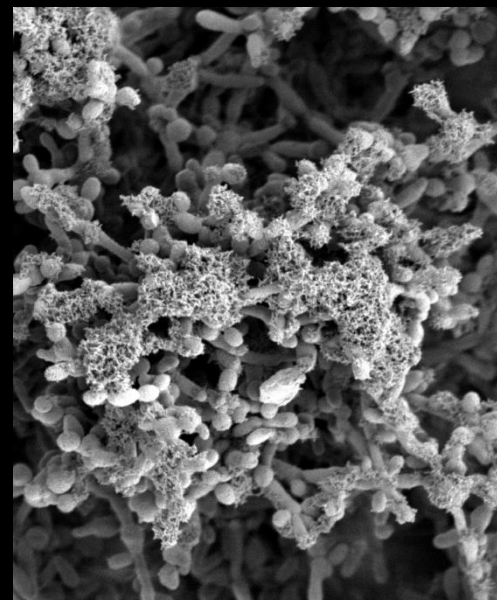
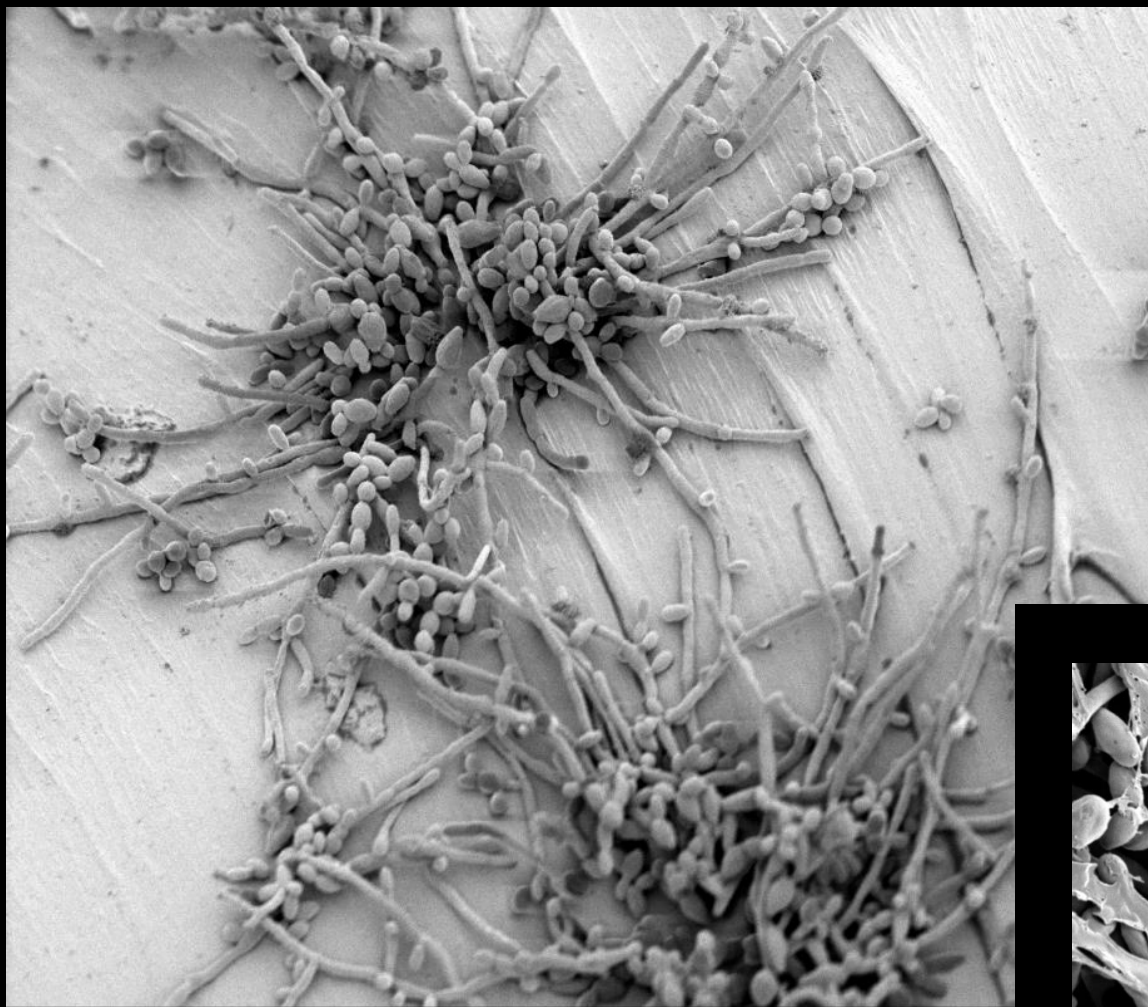
124 bp – *S. epidermidis*

546 bp - *ica* operon

Průkaz klíčových složek biofilmu (CRAu stafylokoků)

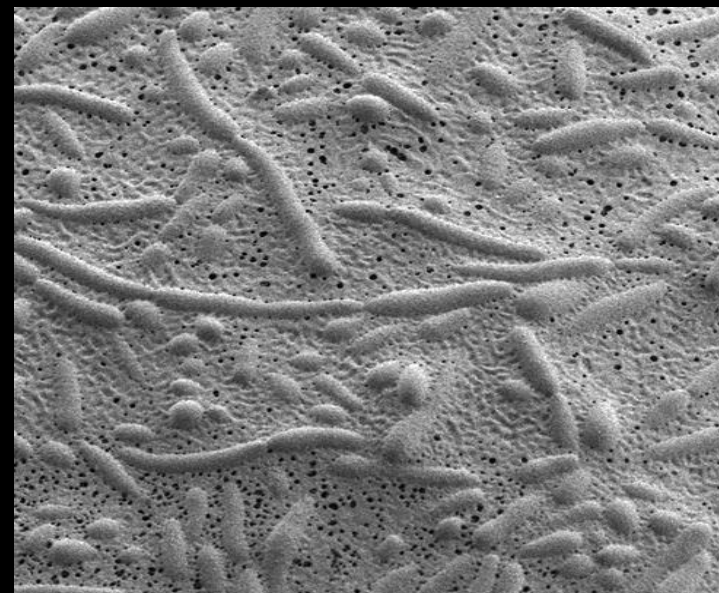
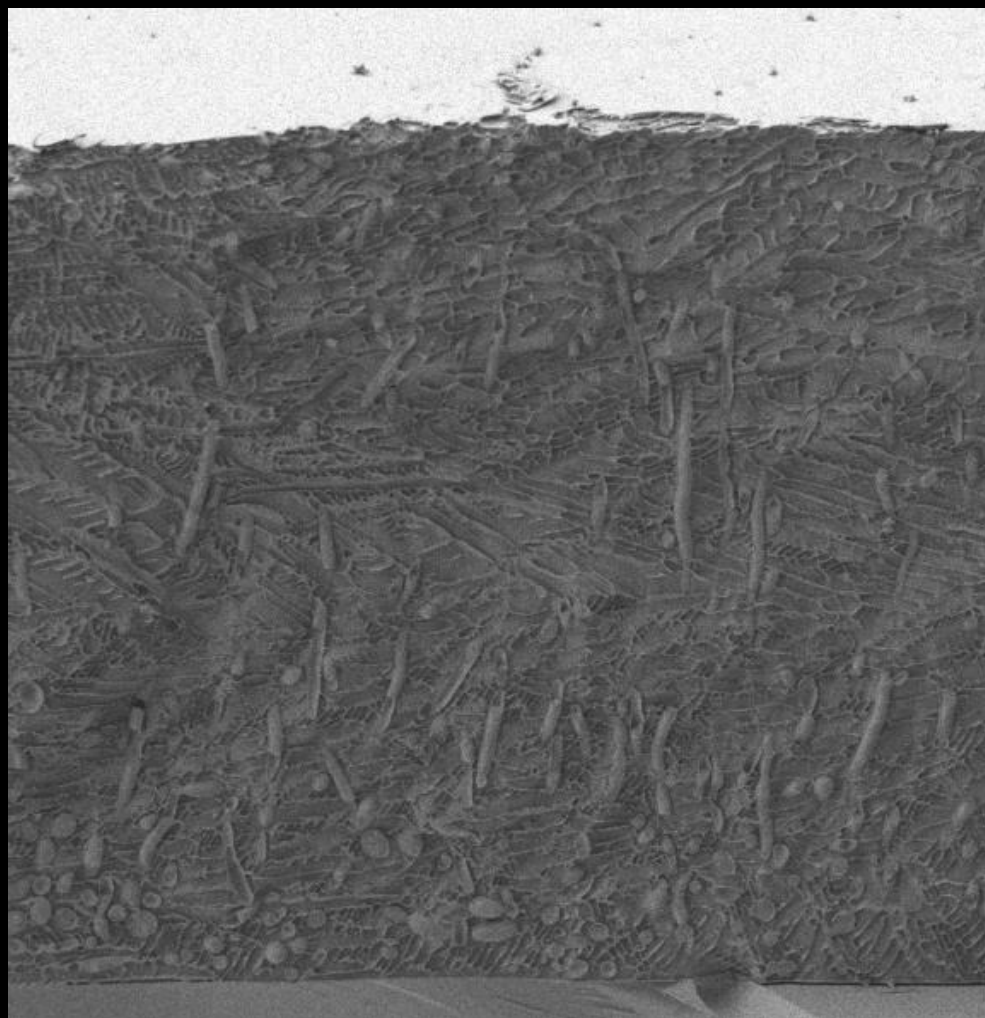


Mikroskopický průkaz (adheze, biofilm): světelná, elektronová, konfokální, aj.



Biofilmy kvasinek rodu *Candida*

Chemická fixace (glutaraldehyd a osmium tetroxid), zpracováno technikou freeze-drying. Rastrovací elektronový mikroskop JEOL 6400 (JEOL).



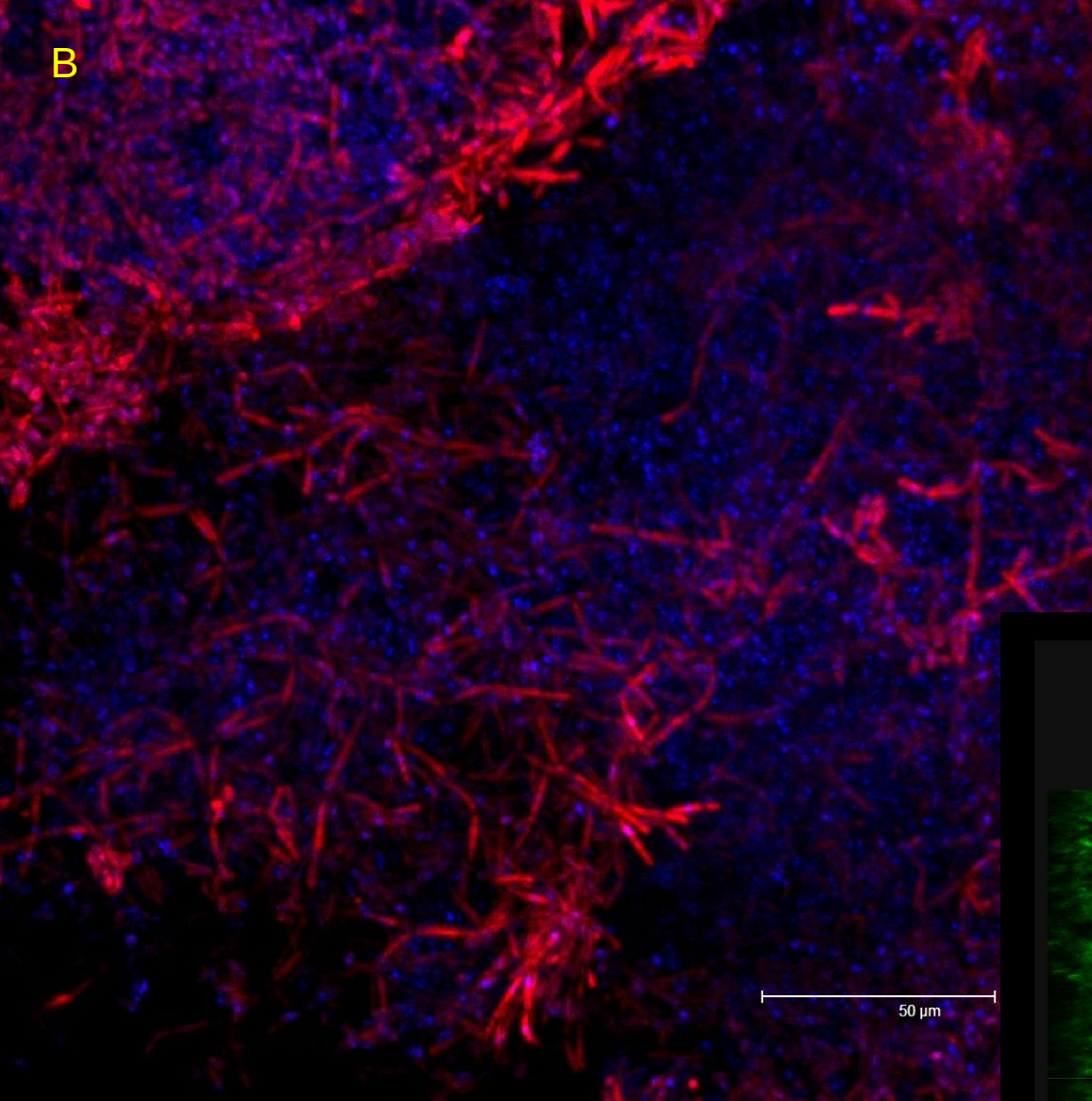
10 μ m

10 μ m

Biofilm *C. parapsilosis*

Vzorek fixován hlubokým zmražením a zpracován technikou mrazového lámání.
v tekutém dusíku (-196 °C) a sušen za nízkých teplot (freeze-drying).
Rastrovací elektronový mikroskop JSM 7401F (JEOL) při -196°C.

B



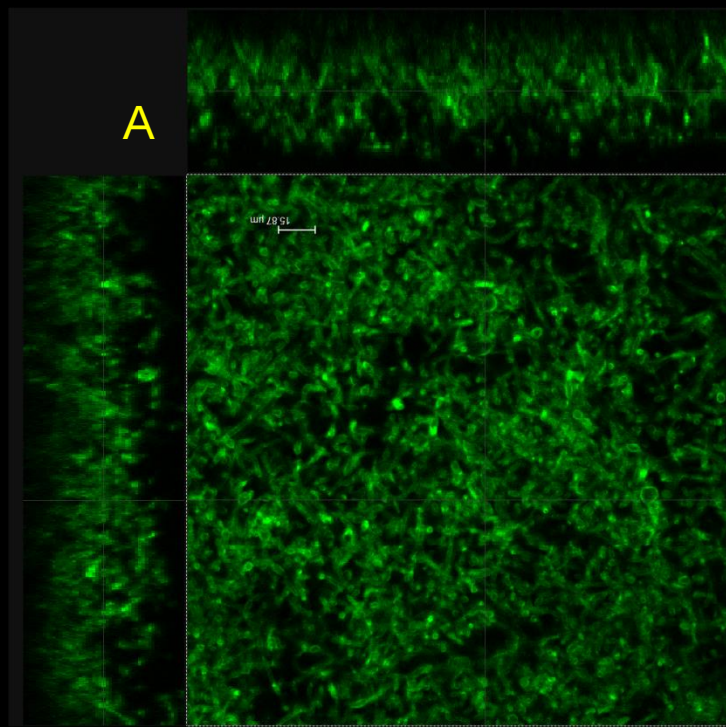
Dvofotonová fluorescenční konfokální mikroskopie biofilmu *C. parapsilosis*

Barveno:

(A) Calcofluor

(B) Hoechst a Texas red

A



Děkuji za pozornost

