



**Значењето на микробиолошката дијагностика
во донесување на клиничка одлука
при инфекции на рани**

Проф. д-р Ана Кафтанџиева

Институт за микробиологија и паразитологија,
Медицински факултет, УКИМ Скопје

Предавање за специјализанти

Дефиниција

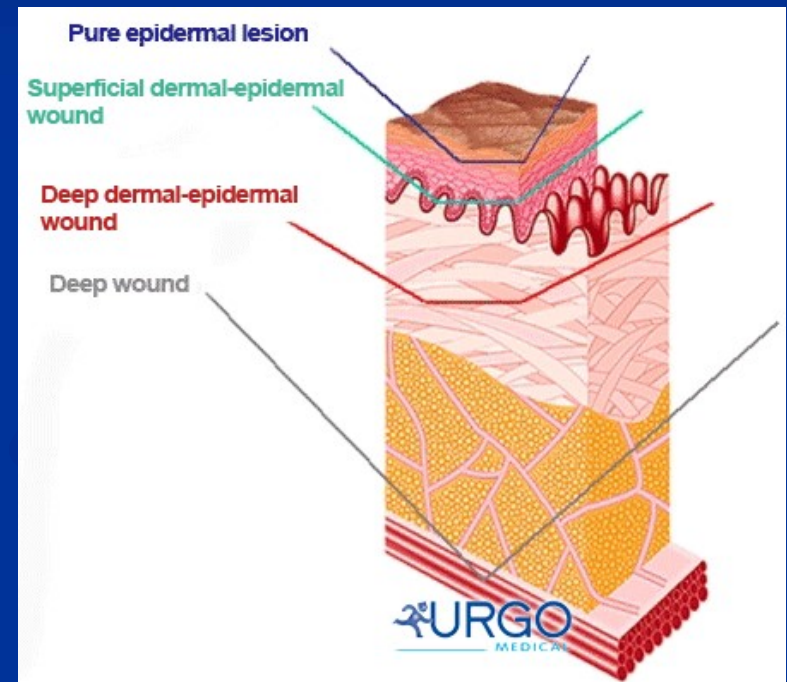
Рана - пореметување на континуитетот и интегритетот на кожата и слузокожата.

- Анатомски и функционален дизбаланс
- Продор на микроорганизмите од околината во лезијата

Настанува како резултат на:

- траума
- патолошки процес

Постојат два типа рани: акутни и хронични



Типови на рани

Акутни рани

Предизвикани со надворешно оштетување на интактна кожа.
Заздравуваат < 4 недели.

- хируршки рани, каснувања, изгореници, помали посекотини, абразии
- појаки трауматски повреди: лацерации, краш и огнострелни повреди



Трауматска повреда



Хируршка рана



Кожна абразија



Изгореници

Хронични рани -

предизвикани со ендогени механизми, кои ја компромитираат циркулацијата, дијабет, континуиран притисок врз кожата

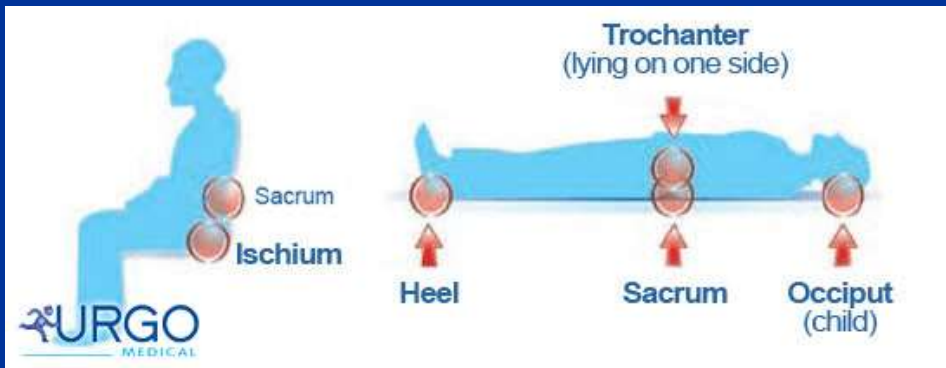
Заздравуваат > 6 недели



Улцерација на ногата
(Leg ulcer)



Дијабетично стопало
(diabetic foot ulcer)



Декубитус (Pressure ulcer)

Класификација на хируршките рани

I. Чиста:

- Неинфицирана, без знаци на инфламација
- Респ, ГИ, ГУ тракт интактни
- Примарно се затвораат и се без дренажа (ризик од инфекција 1-3%)

Пр: експлоративна лапароскопија, мастектомија, дисекција на врат, васкуларна операција, хернија, спленектомија

II. Чиста-контаминирана:

- Респ, ГИ, ГУ тракт се оштетени, но под контрола
- Без необична контаминација
- Рани кои се механички дренирани (ризик од инфекција 7-10%)

Пр: Операции на жолка, хепар, гастрична хирургија, Whipple, хирургија на колон, операции на бронх

III: Контаминирани:

- Отворени, свежи, акцидентални рани
- Големо нарушување на стерилните техники
- Излевање на содржината од ГИ тракт
- Акутна, непурулентна инфламација (ризик од инфекција 20-25%)

Пр: Инфламиран апендикс, излевање на жолчката во холедокот, дивертикулитис, ректална хирургија, пенетрирачки рани

IV: Нечисти:

- Стара трауматска повреда, девитализирано ткиво
- Присутна инфекција или перфорација
- Организми присутни ПРЕД процедурата (ризик од инфекција 40%)

Пр: Абсцес, перфорирани црева, перитонитис, позитивни култури пре-оп

Дефиниција

Контаминација: присуство на бактерии кои не се размножуваат во раната (пр. повеќето бактерии од почвата не се размножуваат во раната).

www.atsu.edu/faculty/chamberlain/Website/wound

Bowler PG, Duerden BI, and Armstrong DB. 2001. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical Microbiology Reviews* 14:244-269

Kirketerp Moller K et al. Distribution, organization and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2008;46(8):2717-2722

Дефиниција

Колонизација: присуство на реплицирачки бактерии атхерирани на раната, без присуство на реакција од страна на домаќинот

- Потекло на бактериите: егзогено (од околината), од околната кожа и ендогено (мукозни мембрани на ГИ, уро-гениталниот тракт и орофарингс)
- Повеќето организми се дел од нормалната флора на кожата (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus coagulase negative*, *Corynebacterium spp*, *Propionibacterium acnes*)

Критична колонизација

- Davis - размножување на микроорганизмите без инвазија, но со влијание на зараснувањето на раните
 - White, Cutting&Kingsley – неспособност за воспоставување баланс меѓу микроорганизмите и имуниот систем, што води кон необјасливо одложено зараснување на раната, но без присутни знаци на влошување или клинички знаци на инфекција
 - Phillips et al - Концептот на критична колонизација го опишува присуството на биофилмот кај хроничните рани
- Бактериите се размножуваат и започнуваат со инвазија,
 - присутни суптилни знаци на инфекција,
 - одложено зараснување на раните

Davis E. Don't deny the chance to heal! Poster presentation – 2nd Joint meeting of the wound Healing Society and the European Tissue Repair Society, Boston, USA, 1996

White RJ, Cutting KF, Kingsley A. Topical antimicrobials in the control of wound bioburden. *Ostomy Wound Management* 2006;52,8:26-58

Phillips PL, Wolcott RD, Fletcher J, Schultz GS. Biofilms made easy. *Wound International* 2010;1(3):1-6

Дефиниција

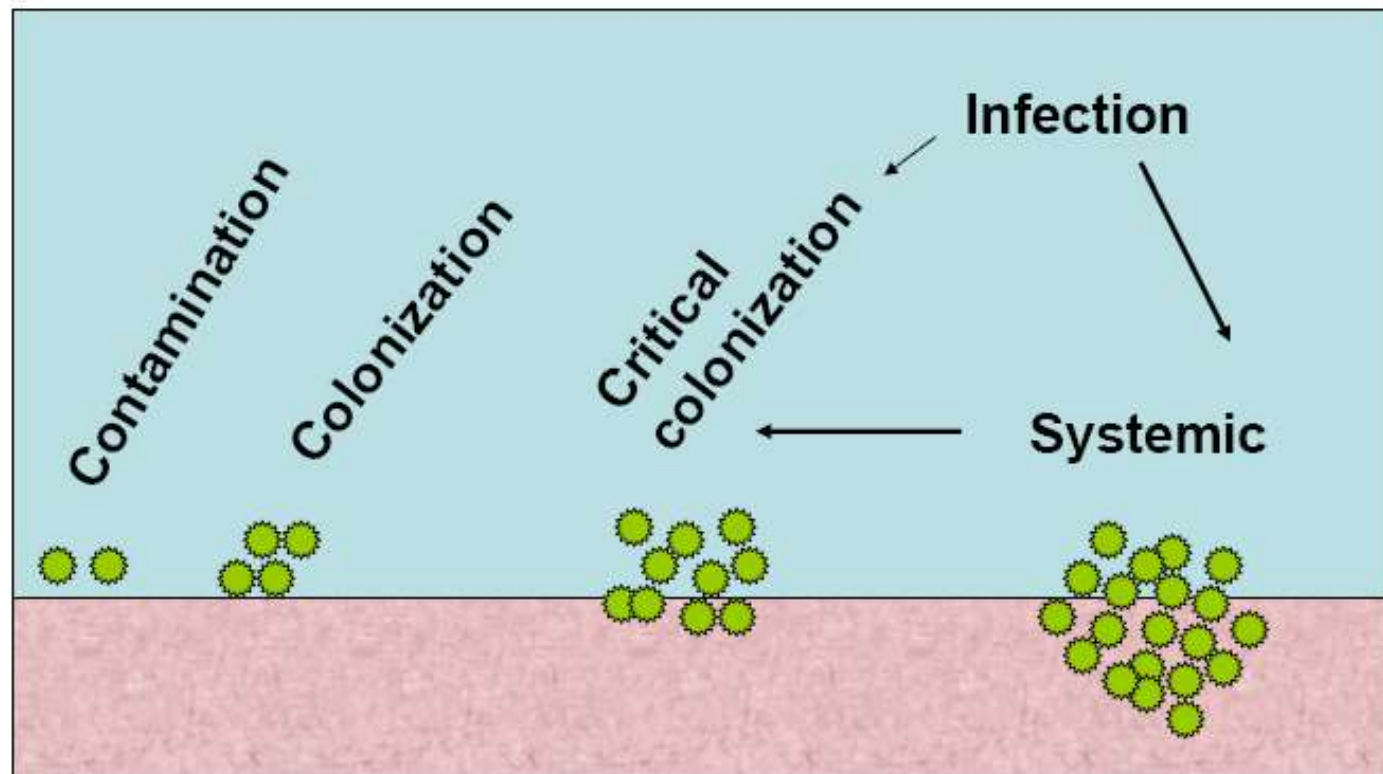
Инфекција: присуство на реплицирачки микроорганизми во раната, кои предизвикуваат реакција од страна на домаќинот

- *Staphylococcus aureus*, бета хемолитични стрептококи (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*), *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, анаеробни бактерии, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas (Xanthomonas)*.

www.atsu.edu/faculty/chamberlain/Website/wound

Bowler PG, Duerden BI, and Armstrong DB. 2001. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical Microbiology Reviews* 14:244-269

The microbiology view of wounds (The planktonic model)



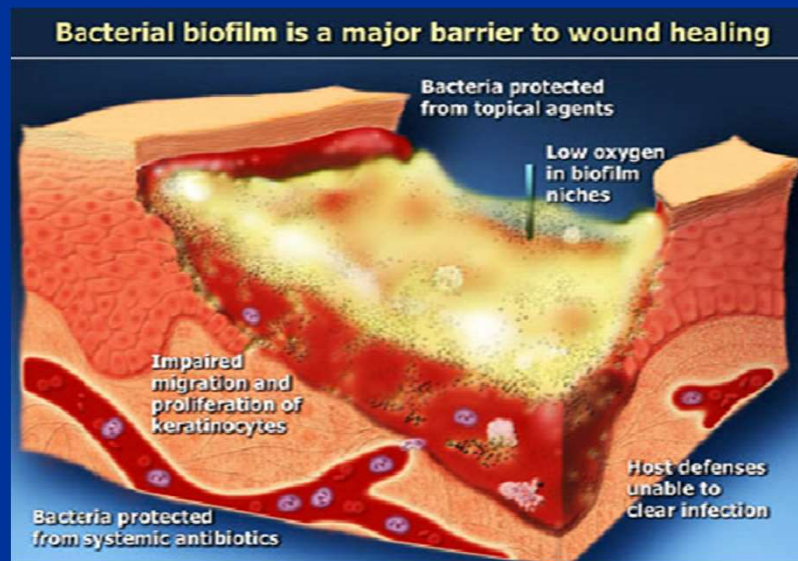
Contamination- infection continuum theory

Замислете ја раната како Петриева плоча?!



Што е биофилм?

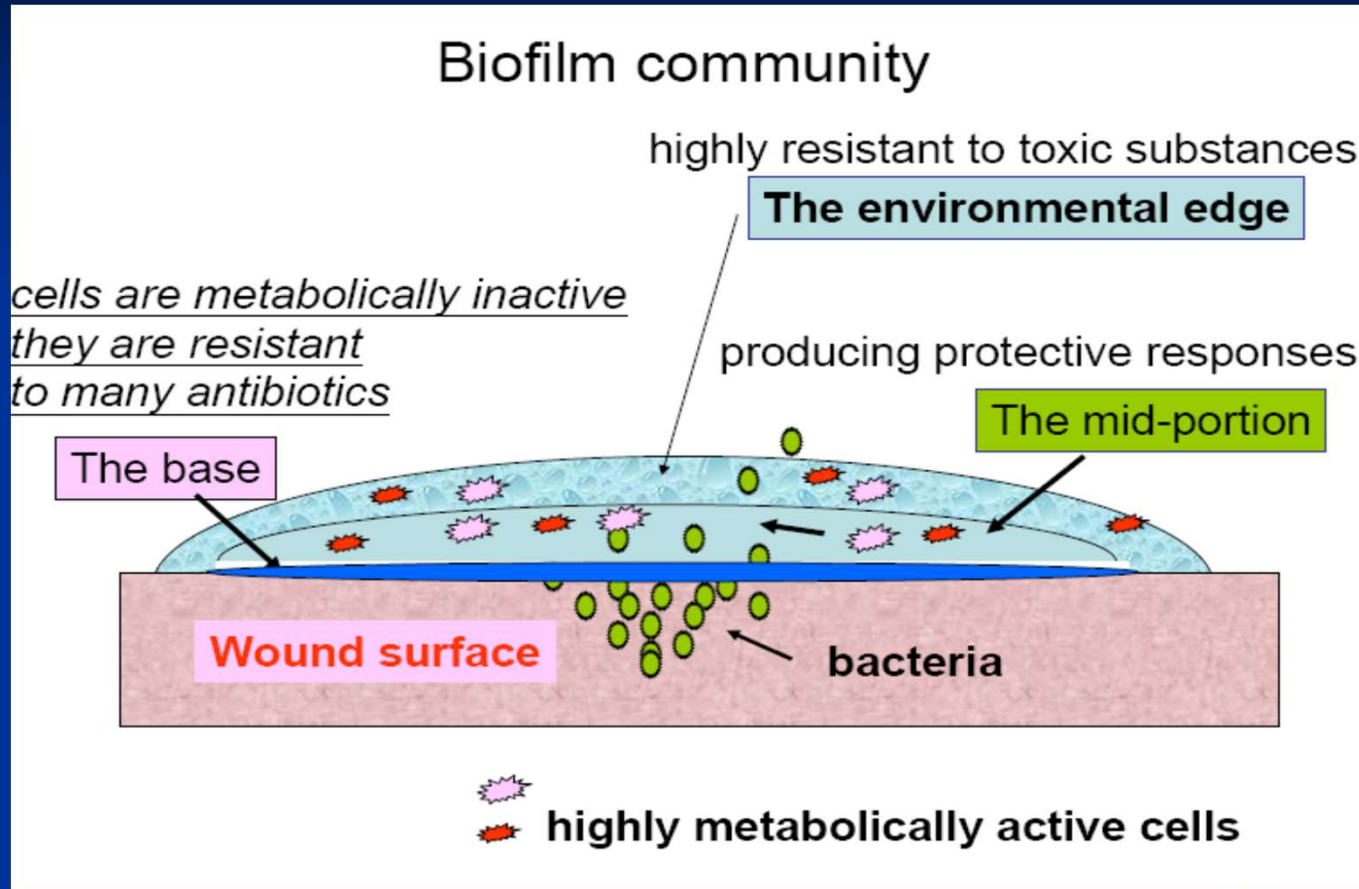
Структурна групација на бактериски клетки атхерирани врз инертна или жива површина, заробени во полимерен матрикс кој самите го продуцираат.



Percival SL, Bowler P. Biofilms and their potential role in wound healing. Wounds 2004;7:234-240

James GA, Swogger E, Wolcott at al. Biofilms in chronic wounds. Wound repair and Regeneration 2008;16,1:37-44

Структура на биофилмот

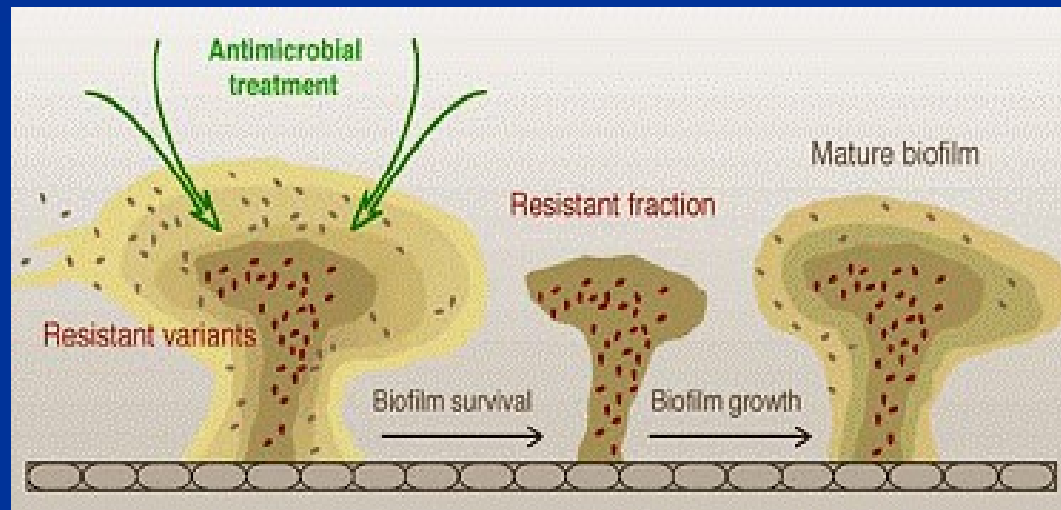


Микроорганизмите во биофилмот се подредени во 3 слоја:

- Површински
- Интермедиерен
- Базален (слој од микроорганизми кои се адхерирани врз површината)

Улога и значење на биофилмот

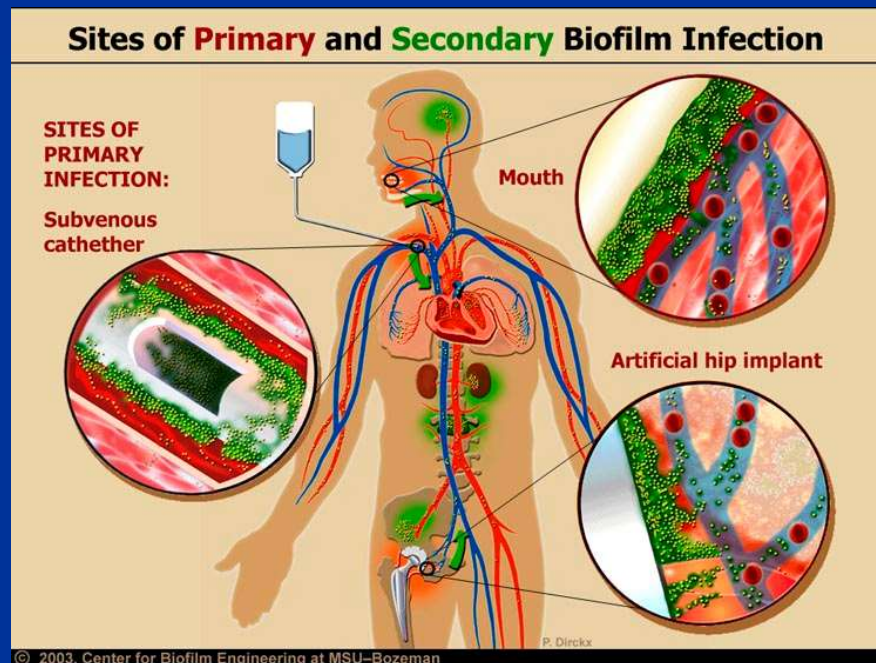
За микроорганизмите - биофилмот ги штити бактериите од: неповолните влијанија на околината, од имуниот систем, од антимикробните средства



Опасност за појава на резистенција претставуваат ткн. **перзистери**= м.о во составот на биофилмот (најчесто припадници на базалниот слој) кои имаат способност да го преживеат првиот "напад" од антибиотикот, а потоа да се активираат и да го регенерираат биофилмот.

Улога и значење на биофилмот

За човекот - Микроорганизмите можат да ги **колонизираат** биомедицинските импланти и транскутаната медицинска опрема што резултира со ризик од создавање на **биофилм** кој може да е причина за различни **хронични** инфекции и болести



Биофилмот кај раните е потенцијална причина за инфекции на хроничните рани (60% хронични рани vs. 6% кај акутните рани)

Микробна флора кај раните

Микробната флора кај раните се менува со тек на време

- **Кај акутни рани** -доминира нормалната флора на кожата

S. aureus и Beta-hemolytic *Streptococcus* (Group B *Streptococcus* и *S. aureus* се најчестите бактерии изолирани од улцерациите кај дијабетично стопало)

■ По околу 4 недели

- Факултативно анаеробни Грам-негативни бацили ја колонизираат раната
 - Најчести бактерии се: *Proteus*, *E. coli* и *Klebsiella*.
- Ако раната подолго перзистира, зафатени се подлабоките структури. Најчесто се изолираат анаероби. Инфекциите често се полимикробни.

- Со продлабочување на инфекцијата на раната, можно е зафаќање на мускулатурата под раната и коската, што доведува до остеомиелит (Најчести предизвикувачи се колиформните бактерии и анаеробите, како и *Staphylococcus aureus*).

- *Enterococcus* и *Candida* често се изолираат од рани.
- Лекувањето на пациентите е индицирано само кога овие организми се присутни во голем број (10^6 CFU/грам ткиво) и ако се единствен изолат

- **Како заклучок:** од хроничните рани во почетен стадиум почесто се изолираат Грам-позитивни бактерии
- Од раните кои траат подолго и кои ги зафаќаат подлабоките структури се изолираат повеќе бактерии (понекогаш дури 4-5 различни видови, вклучувајќи ги анаеробите)
Почести се Грам-негативните бактерии

Од колонизација до инфекција?

- Многу фактори влијаат на прогресија на процесот од колонизација кон инфекција
- Инфекција = доза x вируленција
домаќин
 - Број на бактерии
 - Фактори на вируленција
 - Ошорност на домаќинот кон инфекција

Улога на домаќинот

- ✓ **Одбраната на домаќинот е најважен фактор кај инфекциите на рани**
- ✓ **Многу локални и системски фактори заедно имаат улога во зголемување на ризикот за инфекција на раните.**

Локални фактори

- Длабочина на раната
- Анатомска локализација
- Страни тела
- Некротично ткиво
- Механизам на повреда
- Намалена перфузија

Системски фактори

- Васкуларни заболувања
- Малнутриција
- Дијабетес
- Алкохолизам
- Хируршка интервенција или зрачење
- Кортикостероиди

Како да препознаеме инфицирана рана?

- Ова е многу тешко.
- Постои континуитет меѓу колонизацијата на раната со патогени бактерии и почетокот на инфекција
- Не постои апсолутно прецизен и сигурен лабораториски тест кој ќе помогне во поставување на дијагноза на инфекцијата

Како да препознаеме инфицирана рана?

Клинички најчести карактеристики на инфицирана рана се:

- ✓ Зголемен ексудат
- ✓ Оток
- ✓ Црвенило
- ✓ Болка
- ✓ Зголемена локална температура
- ✓ Целулит околу раната, дисколорација, склоност кон крварење, непријатен мирис

Микробиолошка дијагностика

Индикацијата за земање примерок ја поставува клиничарот.

Примероци од раните за микробиолошка анализа се земаат кога:

- има клинички знаци на инфекција
- нема клинички знаци на инфекција, но раната се влошува (дијабетично стопало)
- раната долго перзистира и не заздравува (хронични рани)

Микробиолошка анализа на рани

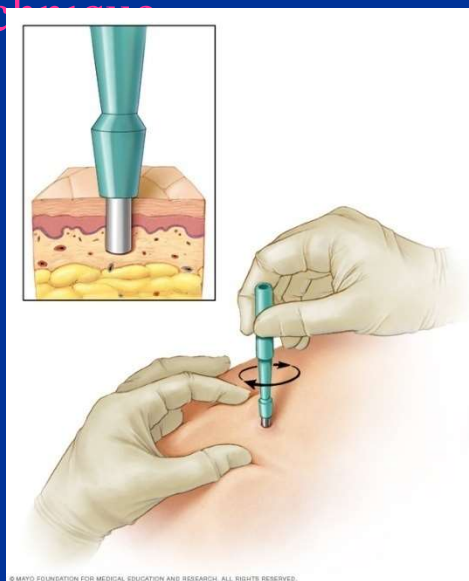
- **Ткиво од раната (биопсија) “златен стандард”**- се зема асептично, од рабовите на промената после дебридман, се култивира на селективни и неселективни подлоги за аеробно и анаеробно култивирање
- (+) најсигурен метод за докажување на инфекција на рани (особено важен за акутни и хируршки рани)
- (-) не е рутински прифатен метод за повеќето типови рани (не се користи за хронични рани), потребна е прецизна хируршка техника, трауматично за пациентот

Bowler PG, Duerden BI, and Armstrong DB. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14:244-269.

Falanga V. Science of wound management. *Wound Bed Preparation* 2001., Smith and Nephew, Hull, England

Микробиолошка дијагноза

- Мултипли биоптични примероци од повеќе делови од површината на изгореницата треба да се земат и да се испратат за хистопатолошка и микробиолошка анализа.
- По чистење на раната со изопропил алкохол, 2 паралелни инцизии на растојание од 1,5 cm и со должина од 2 cm се прават на изгореницата за да се добие примерок од подлабоките слоеви на кожата и поткожното масно ткиво. Како алтернатива, биоптичен примерок со тежина од 0,02-0,5 gr може да се добие со 3-mm **punch-biopsy technique**.



Транспорт на биоптичен примерок

- Примероците од ткиво треба да се транспортираат во стерилни шишенца со капаче кое добро затвора. Во шишенцето се става парче стерилна газа, навлажнета со физиолошки раствор и врз неа се става парчето ткиво, убаво се затвора и се носи во микробиолошка лабораторија за 1-2 часа за микробиолошка обработка.





Секрет од раната- се аспирира со игла и шприц, особено за гнојна содржина од интактни кожни апсцеси, како и длабоки џебови со течност под површниот дебри.

(+) Секогаш кога може, треба да се земе. Земањето е без траума, со минимална инвазија. Предност пред брисевите, бидејќи го овозможуваат преживувањето на бактериите подолго време.

Bowler PG, Duerden BI, and Armstrong DB. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14:244-269.

Bowler PG, Davies BJ. The microbiology of acute and chronic wounds. *Wounds* 1999;11:72-79

Bowler PG, Davies BJ. The microbiology of infected and noninfected leg ulcers. *Int J Dermatol* 1999;38:101-106

Falanga V. Science of wound management. *Wound Bed Preparation* 2001., Smith and Nephew, Hull, England

Брис од рана

Два бриса → боење по Грам
→ култивирање

- Процедурата е едноставна, ефтина, неинвазивна и погодна за повеќето типови рани.
- Овозможува семиквантитативно одредување на растот на бактериите - слаб раст (1+) до изразен раст (4+), што е многу полесно од квантитативна анализа.
- Осетливи се на сушење и изложеност на кислород, но доколку се транспортира во соодветен транспортен медиум, овозможува преживување на аероби и анаероби



Gilchrist B. Taking a wound swab. Nursing Times (NT Plus) 2000; Vol.96(4):27

Bowler PG, Davies BJ. The microbiology of acute and chronic wounds. Wounds 1999;11:72-79

Bowler PG, Davies BJ. The microbiology of infected and noninfected leg ulcers. Int J Dermatol 1999;38:101-106

Како да се земе брис од рана?

Потребно:

- физиолошки раствор
- брис
- транспортен медиум

1. Раната се чисти со слаб млаз на физиолошки раствор, се додека не се исчисти од нечистотијата (debris).
 - отстранување на контаминанти
 - се чека 1-2 минути пред да се земе брис
2. На раната да не се аплицираат антисептички раствори или локални анестетици, кои може да ги убијат бактериите и да се добие лажно негативен резултат

3. Да се навлажи брисот пред да се допре раната (ако раната е сува). Брисот така повеќе апсорбира и се зголемува можноста за опстанок на бактериите до нивното култивирање. Ако раната е влажна, може да се употреби сув брис.
4. При земање материјал, брисот треба да се ротира и да се движи во цик-цак линија преку раната, особено на оние места кои покажуваат најизразени знаци на инфекција
5. Да се транспортира брисот до микробиолошка лабораторија во транспортен медиум колку што може побрзо (до 2 часа). Ако не е можно брисот да се култивира набргу по земањето, треба да се чува на собна температура.



Микробиолошка дијагностика

Интерпретација на наодите

Во предвид се зема:

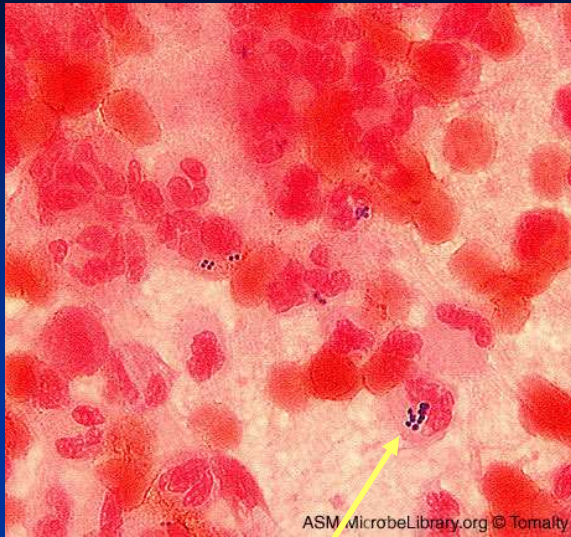
1. Клинички податоци за видот на раната
2. Клинички податоци за траење на раната
3. Клинички податоци за локализација на раната
4. Податоци за основната болест
5. Податоци за претходна антибиотска терапија

СЕКОЈ НЕЈАСЕН СЛУЧАЈ



РАЗГОВОР МЕЃУ КЛИНИЧАРОТ И МИКРОБИОЛОГОТ

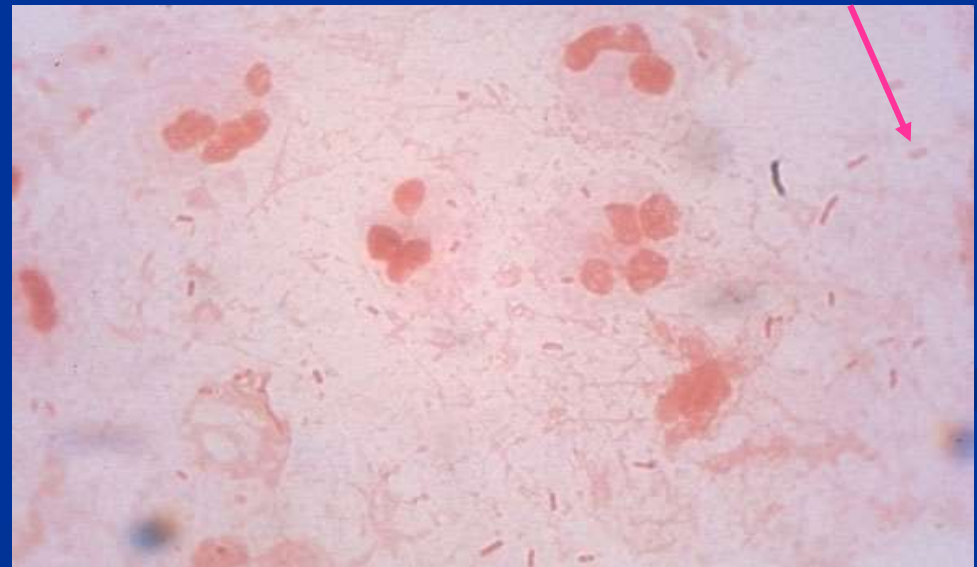
Директни препарати од рани



Грам-негативни бацили
и леукоцити



Грам-позитивни коки
и леукоцити



Директен препарат боен по Грам

- Комбинирано присуство на леукоцити и бактерии е добар индикатор за инфекција.
- Директниот препарат е соодветен во детекција на причинителот на инфекција при чисти хируршки рани, кога инфекцијата е монобактериска.
- Кај изгореници или дијабетично стопало кога е присутна мешана аеробна-анаеробна микрофлора, директниот препарат има мала вредност.

Микроскопирање на примерокот од рана

- Присуство на бактерии кои можат да се видат во препарати по Грам значи дека нивниот број е 10^5 до 10^6 бактерии /грам ткиво или ml секрет
- Бактериите присутни во препаратот треба да корелираат со културата со цел да се открие доминантниот патоген.



Култивирање

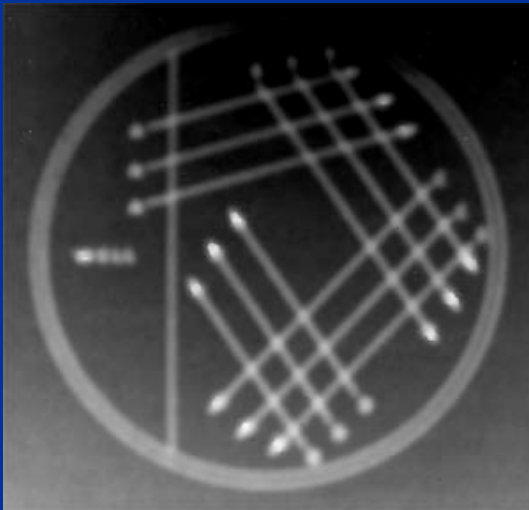
- Селективни и неселективни подлоги за аеробно и анаеробно култивирање на бактерии и на габи (при имунодефициентни состојби или на барање на клиничар). Површните рани не се култивираат за анаеробни бактерии!
- По инкубација од 24-48h се прави семиквантитативна и квалитативна анализа. Пр. растот на потенцијалните аеробни патогени (*St. aureus*, бета хемолитични стрептококи и *P. aeruginosa* се изразува како слаб (1+) до одличен (4+).

Култивирање

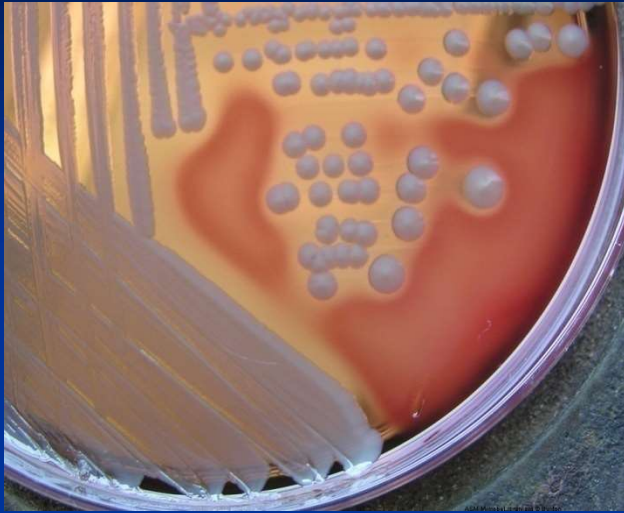
- Columbia агар
- Schaedler агар
- Гликозен бујон
- CALB подлога



Засадување со разредување



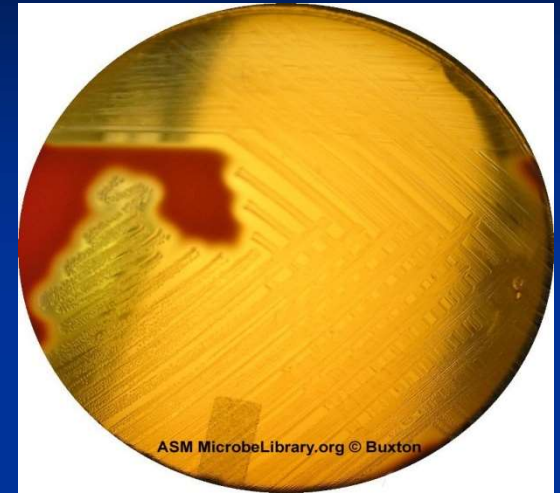
Култивирање



Staphylococcus aureus



Acinetobacter baumannii



Streptococcus pyogenes



Pseudomonas aeruginosa



E. coli



Најчести изолати од примероци од рани и корелација меѓу микроскопскиот препарат и култивирањето

Кафтанџиева А, Цветаноска С, Витанова О, Мирчевска Г, Цековска Ж.

Институт за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет,
УКИМ Скопје, Р. Македонија

Трет симпозиум за превентивна медицина
1-3 ноември 2018, Струга

Материјал и методи

❖ Во период од една година (2017) на Институтот за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет, Скопје беа обработени вкупно 3463 примероци од рани:

- брис

- пунктат

- ексудат

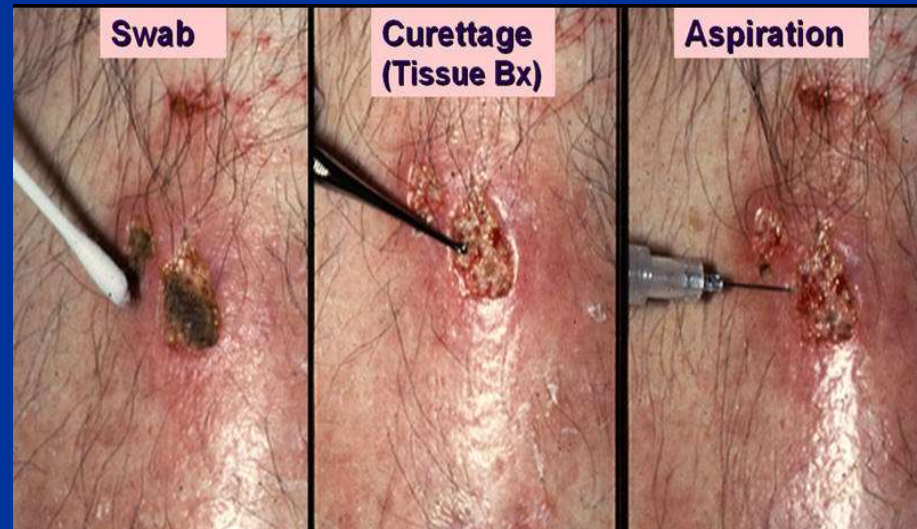
- ткиво

- брис од дренаж

- брис од дојка

- брис од папок

- брис од катетер



❖ Добиени од пациенти хоспиализирани во Универзитетските клиници во кампусот „Мајка Тереза“, Градската болница „8 Септември“ и Специјалната болница за хируршки болести „Св. Наум Охридски“ во Скопје

Инокулација на примерокот на стандардни подлоги:

- Колумбија агар со 5% овча крв
- Шедлер агар
- Гликозен бујон
- *CALB* агар за изолација на габичи

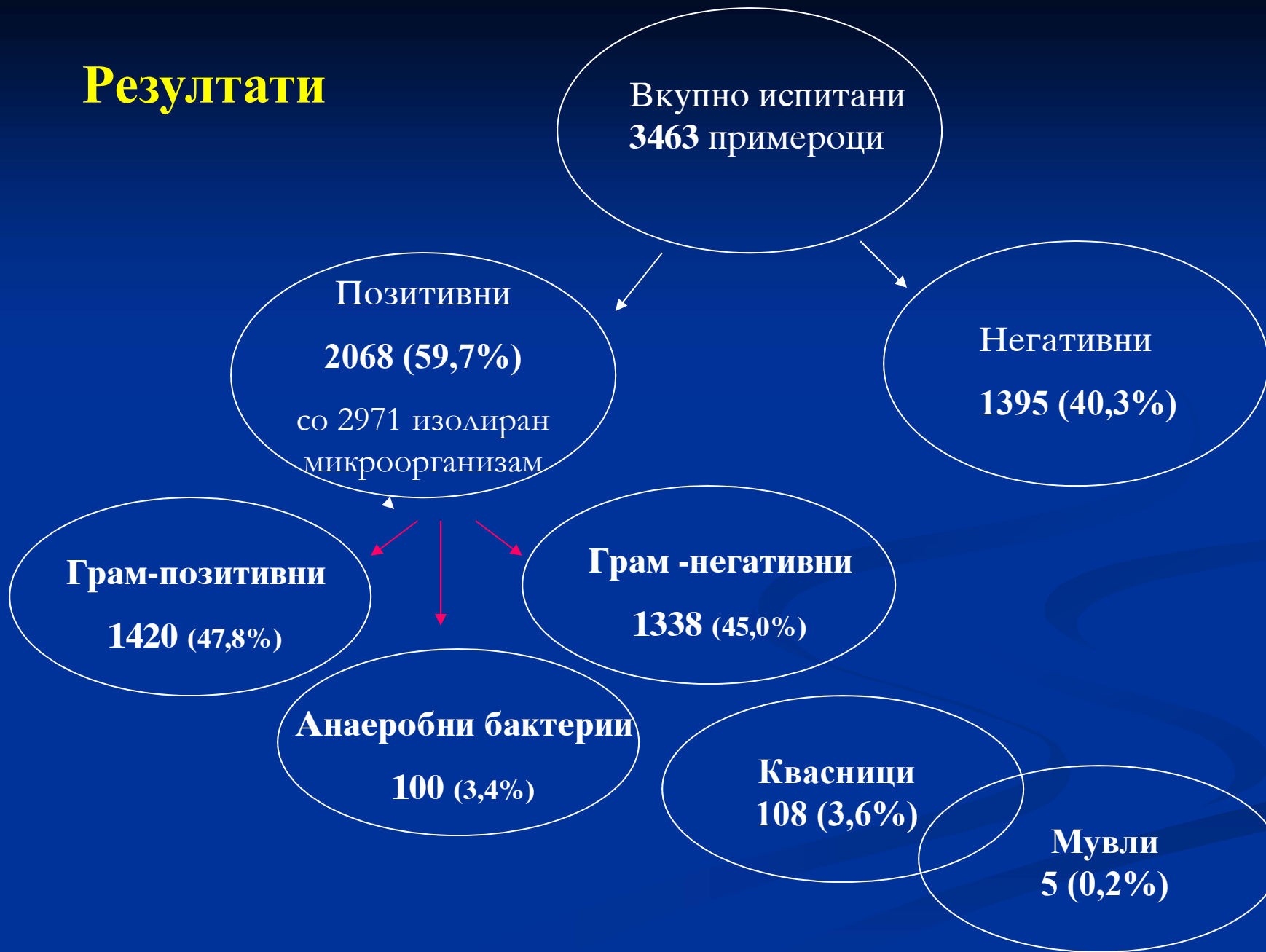


Плочите се инкубираат на 37°C,
24h за аеробно и
48h за анаеробно култивирање

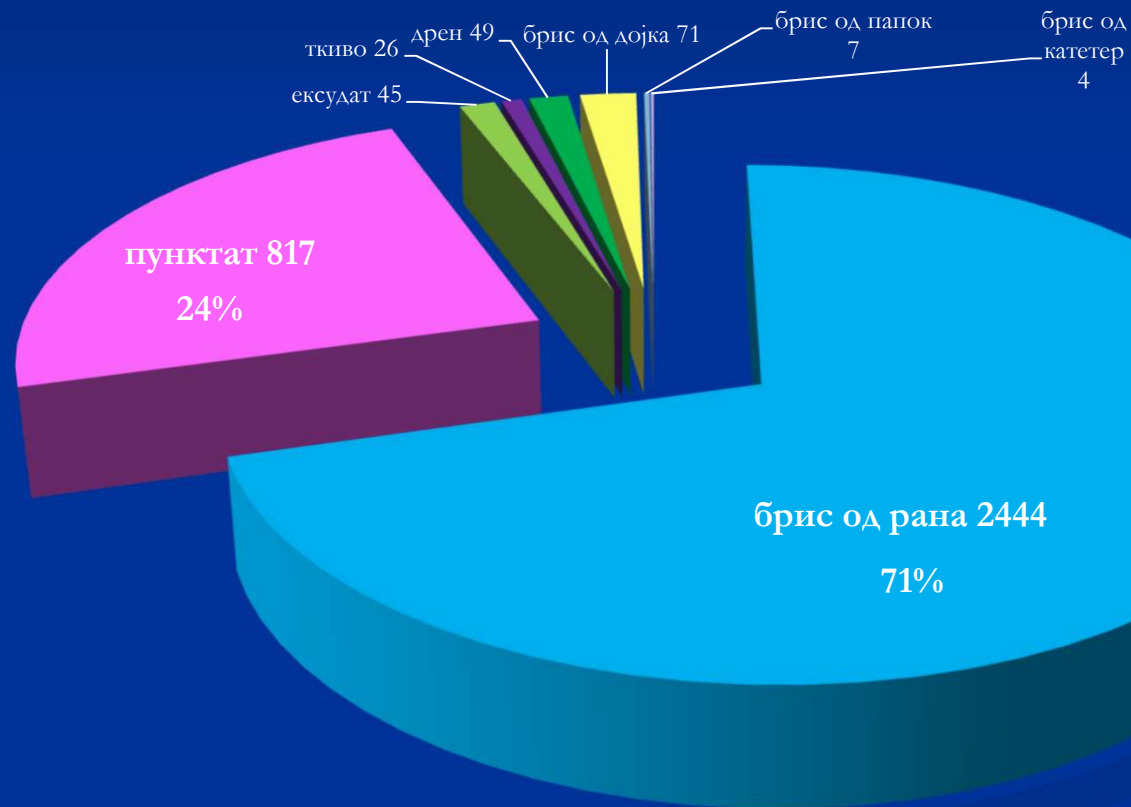


- ❖ *Автоматизиран Vitek 2 систем* за идентификација на сите анаероби и потврда на идентификацијата и на осетливоста на аеробите

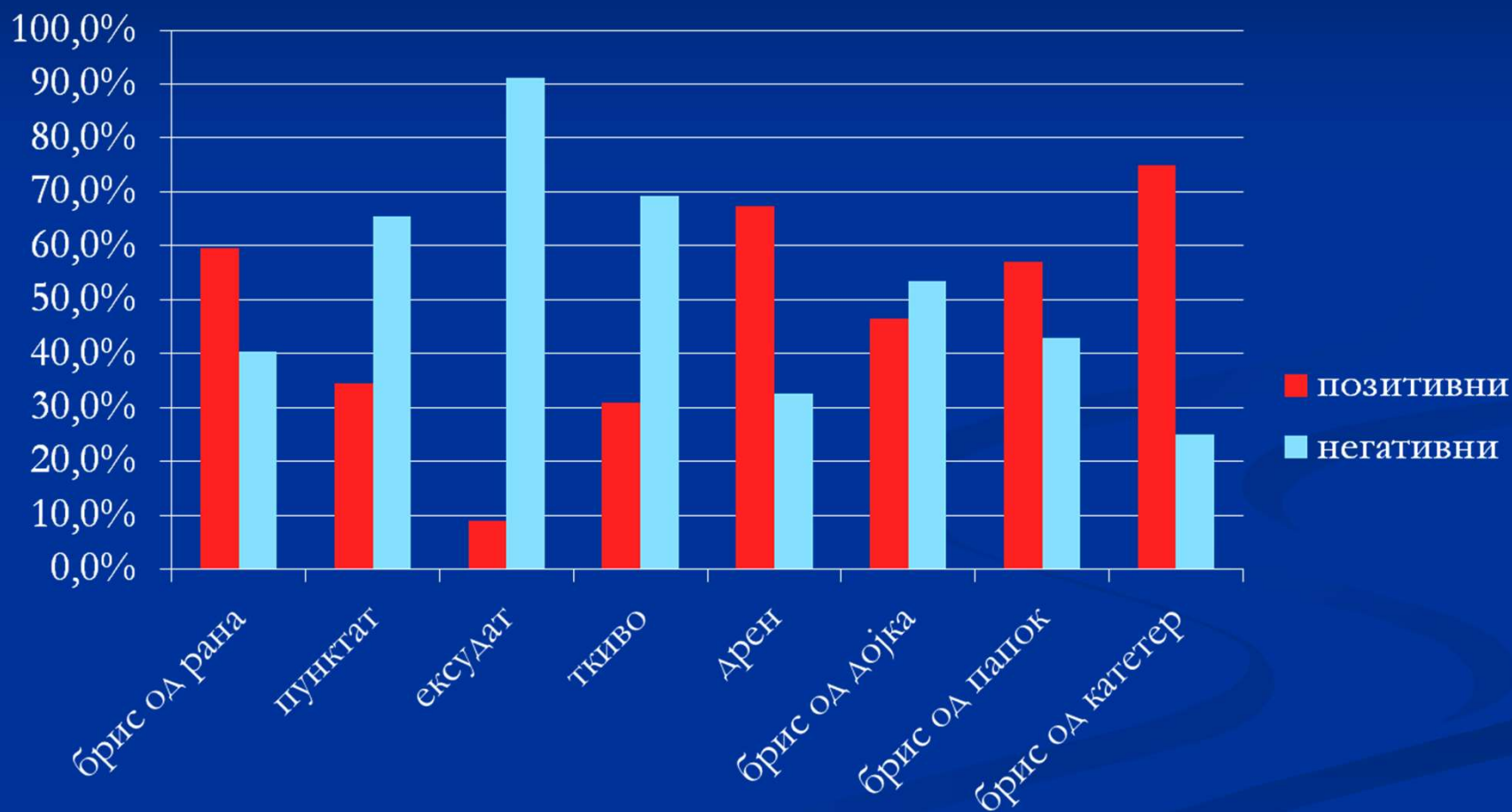
Резултати



Вкупен број на примероци - 3463

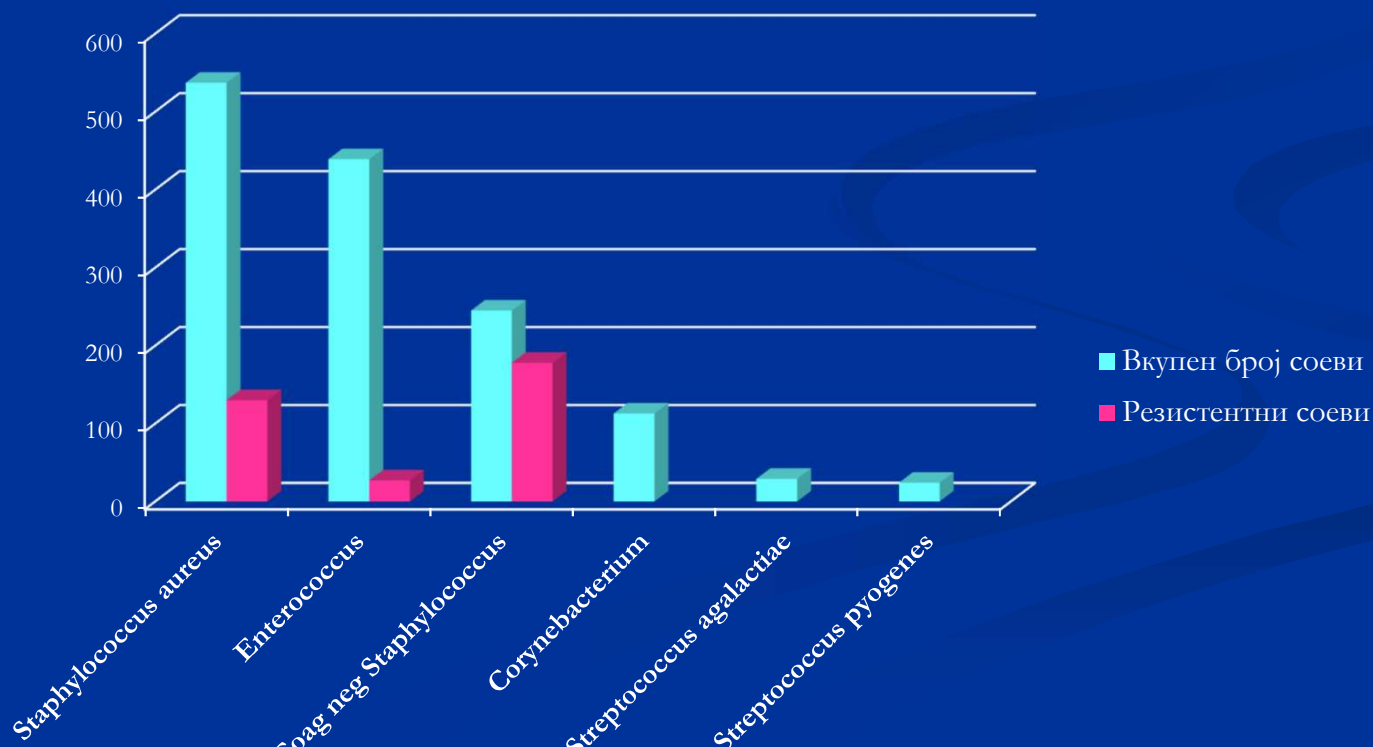


Позитивни 2068 (59,7%) и негативни 1395 (40,3%) примероци од рани

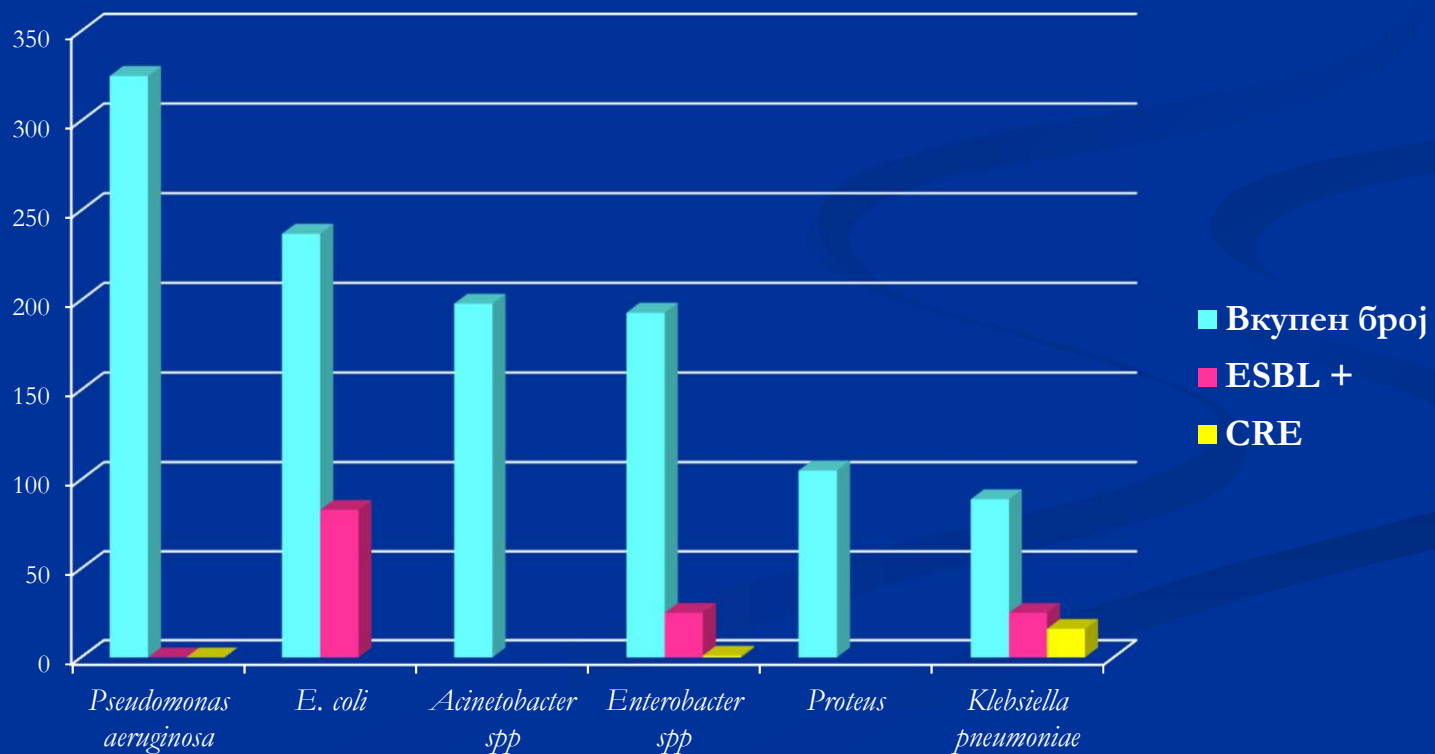


Најчести изолати (вкупен број 2971)

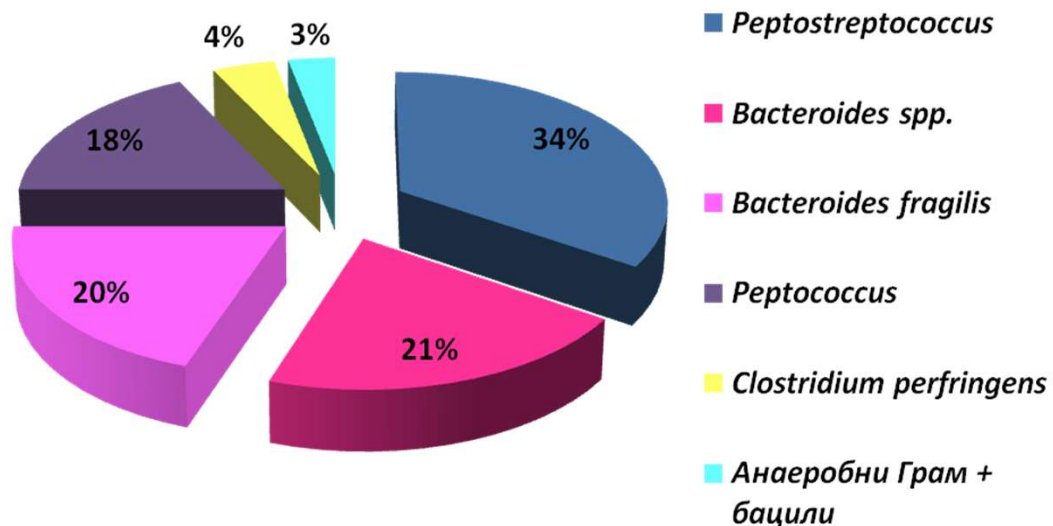
Грам-позитивни бактерии	Вкупно 1420	Резистентни
<i>Staphylococcus aureus</i>	537	MRSA 130 (24,2%)
<i>Enterococcus</i>	439	VRE 27 (6,2%)
<i>Coag. neg. Staphylococcus</i>	245	CoNS-MR 178 (72,6%)
<i>Corynebacterium</i>	113	
<i>Str. agalactiae</i>	29	
<i>Str. pyogenes</i>	24	



Грам-негативни бактерии	Вкупно 1338	ESBL +	CRE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	325		IMI- 38% MEM- 44%
<i>E.coli</i>	237	83 (30,4%)	
<i>Acinetobacter spp.</i>	198		IMI- 81% MEM- 83%
<i>Enterobacter cloacae</i>	193	25 (13%)	1 (0.5%)
<i>Proteus mirabilis</i>	105		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	89	25 (22,5%)	16 (18%)

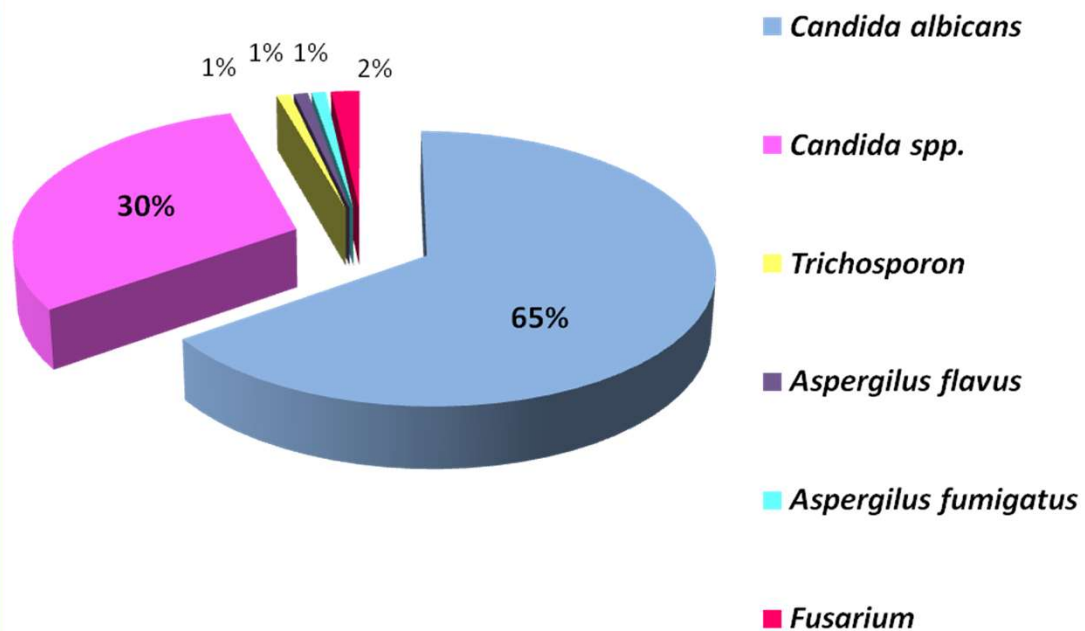


Анаеробни бактерии изолирани од различни примероци од рани



Анаеробни бактерии	Вкупно 100
<i>Peptostreptococcus</i>	33
<i>Bacteroides spp.</i>	20
<i>Bacteroides fragilis</i>	19
<i>Peptococcus</i>	17
<i>Clostridium perfringens</i>	4
Анаеробни Грам + бацили	3

Квасници и мувли изолирани од различни примероци од рани



Квасници и мувли	Вкупно 113
<i>Candida albicans</i>	73
<i>Candida spp.</i>	34
<i>Trichosporon</i>	1
<i>Aspergillus flavus</i>	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1
<i>Fusarium</i>	2

Споредба на наодите од културелното испитување (позитивни наоди) со директните микроскопски препарати

Бактерии	Le	Le, бактерии	бактерии	Негат. дир. пр	Вкупно
<i>Klebsiella spp.</i>	30	34	8	17	89
<i>Acinetobacter spp</i>	33	39	33	93	198
<i>Pseudomonas</i>	88	96	33	108	325
<i>Proteus</i>	24	49	15	17	105
<i>E. coli</i>	54	86	27	70	237
<i>Enterobact / Serrat.</i>	71	33	14	75	193
<i>St. aureus</i>	109	79	30	189	407
<i>MRSA</i>	29	25	22	54	130
<i>Enterococcus</i>	120	156	61	102	439
<i>Streptococcus spp.</i>	7	18	12	16	53
<i>Staphyloc. coag. 0</i>	41	41	15	148	245
<i>Corynebacter. spp</i>	45	13	10	45	113
Anaerobes	29	34	8	29	100
Вкупно	665	722 (43%)	287		
	1674 (63%)			960 (37%)	2634

Споредба на наодите од културелното испитување (негативни наоди) со директните микроскопски препарати

Леукоцити	Бактерии	Негативен микроскопски препарат	Вкупно
77	63	1255	1395

140 (10%)

(90%)

Кај 1395 примероци кои беа со негативни култури, 1255 (90%) беа со негативна култура и препарат, а 140 (10%) беа со позитивен препарат.

Заклучок

- Следењето на микробната флора во примероците од рани, особено присуството на резистентни бактерии, е важно за:
 - одредување на соодветна терапија
 - имплементација на соодветни мерки за контрола на инфекциите.
- Овие мерки не може да се применат ако се базирани само на микроскопскиот препарат (43% на совпаѓање меѓу култивирањето и микроскопското испитување). Затоа култивирањето на примероците од рани е задолжително.
Сепак, правењето на директен микроскопски препарат е пожелно, бидејќи може да помогне за правилна интерпретација на микробиолошките наоди.

- Резултатите од микробиолошкото испитување треба да се интерпретираат согласно достапните информации (тип на рана, локализација, знаци на инфекција, начин на земање и време на испраќање на примерокот итн.)
- Постојаната комуникација меѓу микробиологот и докторот-клиничар е важна
- Само со ваков пристап се овозможува заштеда на време и намалување на трошоци, а со цел да се овозможи соодветно третирање на инфицираните рани.

МИКРОБИОЛОШКА ДИЈАГНОСТИКА

Кога имате можност да бирате дали да испратите малку или многу материјал за култивирање, испратете многу.

Испраќајки само еден брис за аеробно, анаеробно и миколошко култивирање, вие всушност верувате во теоријата на атоми, а не во теоријата на микроби.

Daniel E. Shapiro

Споредба на наодите од микроскопскиот препарат и од култура

Препарат - Култура +	<ul style="list-style-type: none">-Ако бројот на бактерии е мал не се гледа во препаратот-Ако има Грам-негативни бацили (потешко се гледаат)- најчесто заради исцрпување на материјалот со претходно засадување на сите хранителни подлоги (затоа се потребни по два бриса)
Препарат + Култура -	<ul style="list-style-type: none">-Артефакти од боењето-Присуство на анаероби, кои при несоодветното процедурирање на примерокот угинале-Контаминанти, кои не се размножуваат во раната-Присуство на неживи бактерии
Култура -	<ul style="list-style-type: none">-Споро-растечки бактерии (difficult-to-grow fastidious organisms)-Несоодветно процедурирање на примерокот во лабораторијата-Давање антибиотици пред да се зема примерокот

