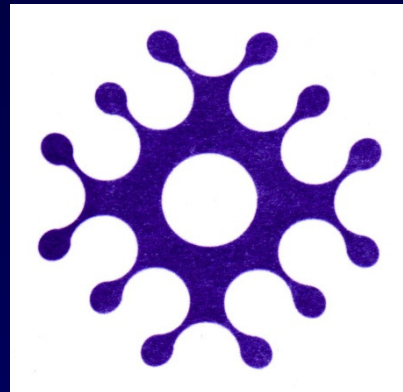


Mikrobiološka diagnostika



KATJA SEME

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, UL MF

Osnovni namen mikrobiološke diagnostike

- najti povzročitelja okužbe
- opredeliti uporabo ustreznega protimikrobnega sredstva

Ključni dejavniki, ki pogojujejo etiološko opredelitev okužbe

- izbira ustrezne kužnine
- pravilen odvzem kužnine
- hiter in pravilen transport kužnine v primernih pogojih
- izbira ustrezne preiskave

Kriteriji, ki jim mora zadostiti dobra kužnina

- ustrezna količina
- reprezentativen vzorec za določeno okužbo
- preprečena možnost kontaminacije vzorca (sterilen pribor za odvzem, aseptični pogoji odvzema)
- takojšenj transport v laboratorij
- takojšnja obdelava v laboratoriju
- odvzem kužnine pred začetkom protimikrobne terapije

Načini odvzema kužnine

1. obrisanje
2. postrganje epitelija
3. izkašljanje
4. uriniranje (urinokultura)
5. defekacija (koprokultura)
6. punkcija (kri-hemokultura, likvor, gnoj, eksudat)
7. biopsija
8. kirurški poseg

☺ TKIVO, TEKOČINE

☹ BRISI

- omejen volumen
- onemogočen neposredni gramski razmaz
- enostavna kontaminacija
- material, iz katerega je konica, lahko zavira rast mikroorganizmov oz. potek diagnostičnih postopkov



Stroka

- Organizacijska struktura
- Organigram
- Imenik
- Strokovni kolegij
- Katalog diagnostičnih preiskav
- Navodila za odvzem in transport vzorcev
- Opisi diagnostičnih preiskav, indikacije, interpretacije

Navodila za odvzem in transport vzorcev

Sprejem vzorcev

Vsak dan od ponedeljka do sobote od **7.30** do **18.00** ure,
ob nedeljah in praznikih od **9.00** do **16.00** ure.

Navodila

- Imunološke preiskave - navodila za odvzem in transport do IMI
- **NOVO** - Bakteriološke in mikološke preiskave - navodila za odvzem in transport do IMI
- Parazitološke preiskave - navodila za odvzem in transport do IMI
- Virološke preiskave - navodila za odvzem in transport do IMI

<http://www.imi.si/>



Diagnostika bakterijskih okužb

Katera(e) patogena(e) bakterija(e) je(so) v kužnini?

preiskava na "patogene bakterije"

Ali je bakterija X v kužnini?

ciljane preiskave na določenega bakterijskega povzročitelja okužbe

Pogosti bakterijski povzročitelji okužb,
ki jih s preiskavo na "patogene bakterije"
ne moremo dokazati

mikoplazme

klamidije

legionele

mikobakterije

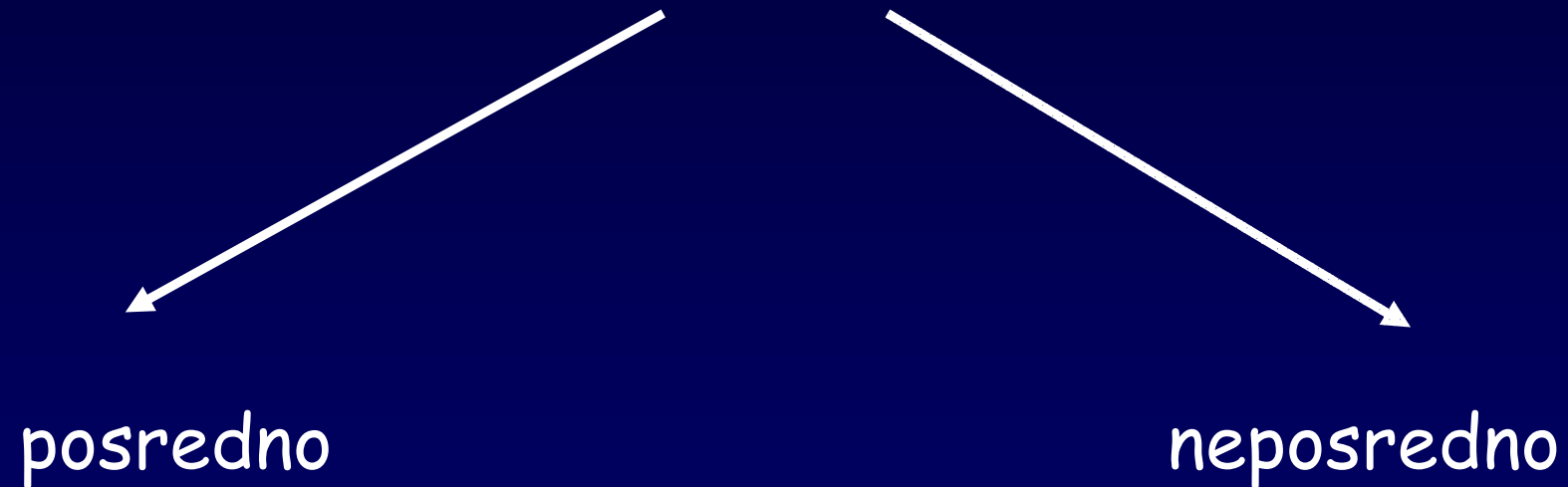
Bordetella pertussis

Diagnostika virusnih okužb

Ali je virus X v kužnini?

Koliko virusa X je v kužnini?

DOKAZOVANJE MIKROBNIH POVZROČITELJEV BOLEZNI



Diagnostika bakterijskih okužb

NEPOSREDNA

- osamitev povzročitelja iz kužnine
- dokaz povzročitelja v kužnini z mikroskopiranjem
- dokaz bakterijskih antigenov v kužnini
- dokaz bakterijskih nukleinskih kislin v kužnini

POSREDNA

- dokaz specifičnih protiteles proti bakterijskim antigenom v bolnikovem serumu

Mikroskopiranje

- svetlobno mikroskopiranje (neobarvani, obarvani preparati)
- fluorescentno mikroskopiranje (fluorescentna barvila - akridin oranž, auramin/rodamin)
- mikroskopiranje v temnem polju
- elektronsko mikroskopiranje

"Hitri" antigenski testi v bakteriologiji

dokaz bakterijskih antigenov v kužnini s pomočjo
znanih specifičnih protiteles

lateksna aglutinacija, encimskoimunski test

imunokromatografski test, imunofluorescenčni test

S. pyogenes (bris žrela)

S. pneumoniae (urin, likvor)

N. meningitidis (likvor)

H. influenzae (likvor)

Dokaz bakterijskega/glivnega povzročitelja okužbe z molekularnimi metodami neposredno v kužnini

za povzročitelja specifičen PCR

utemeljen klinični sum na okužbo z določenim povzročiteljem
npr. *E. coli*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp.

večkratni PCR

hkrati poteka več za povzročitelja specifičnih PCR

širokospektralni PCR

npr. pomnoževanje gena 16S ali 23S rRNA (vse bakterije)
gena 18S rRNA (vse glive)

Osamitev bakterij iz kužnine

- zasajevanje gojišč - kultivacija
- identifikacija izolata

$\geq 10^5$ bakterijskih celic / ml kužnine

vidne v mikroskopskem preparatu iz kužnine

$\geq 10^2 - 10^3$ bakterijskih celic / ml kužnine

rast na trdnem gojišču

≥ 10 bakterijskih celic / ml kužnine

rast v tekočem gojišču

Antibiogram

laboratorijska metoda, s katero *in vitro* ugotavljamo občutljivost / odpornost določenega bakterijskega izolata za / proti antibiotike / om

AST/ART

Metode za določanje bakterijske občutljivosti

- disk difuzijska
- dilucijske (makro-, mikro-, agar dilucijski)
- difuzija antibiotičnega gradienta (E-test)
- avtomatizirani sistemi
- molekularne metode

Disk difuzijska metoda

Prednosti

standardizirana
prilagodljiva
najbolj enostavna
najcenejša

Pomanjkljivosti

ni avtomatizirana
odvisna od inokuluma
ni primerna za PRP, VRE,
VISA

Dilucijske metode

Prednost

kvantitativni rezultati
(MIK)

Pomanjkljivosti

izvedbeno zahtevnejše
manj prilagodljive
odvisne od inokuluma
dražje

Difuzija antibiotičnega gradienta

E-test

Prednosti

kvantitativni rezultati (MIK)
enostavna izvedba
natančnost, ponovljivost
toleranca za inokulum

Pomanjkljivost

visoka cena

Kriteriji za interpretacijo rezultatov antibiograma

CLSI

Clinical and Laboratory Standards Institute

EUCAST

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Opredelejevanje mehanizma bakterijske odpornosti

beta-laktamaza (penicilinaza)

MRSA

VRE

ESBL

ampC

karbapenemaze

iMLSB

Molekularne metode za odkrivanje bakterijske odpornosti proti antibiotikom

- uporabne za odkrivanje specifičnih genov, ki pogojujejo bakterijsko odpornost (*mecA*, *vanA*, *vanB*, *vanC*, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV})
- uporabne za odkrivanje točkastih mutacij specifičnih genov, ki privedejo do bakterijske odpornosti (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *rpoB*, *embB*)

Pomanjkljivosti molekularnih metod za odkrivanje bakterijske odpornosti

- zaradi visoke specifičnosti z njimi ne moremo odkriti novih mehanizmov odpornosti
- odsotnost gena ne izključuje možnosti drugih mehanizmov bakterijske odpornosti
- "najdemo samo tisto kar ciljano iščemo"
- za vsak antibiotik je potreben poseben test
- prisotnost gena, ki pogojuje odpornost, še ne pomeni, da se bo gen izražal
- lažno pozitivni rezultati zaradi kontaminacije

DOKAZOVANJE VIRUSNIH OKUŽB



posredno

neposredno

Posredno dokazovanje virusnih okužb ("serologija")

dokaz specifičnih protiteles v bolnikovem serumu

zanesljiva potrditev akutne okužbe:

prisotnost specifičnih protiteles IgM

serokonverzija ali

pomemben porast koncentracije IgG

(testiranje parnih serumskih vzorcev)

Določanje koncentracije protiteles

encimskoimunska metoda (EIA)

imunofluorescenčna metoda

reakcija vezave komplementa (RVK)

inhibicija hemaglutinacije

metoda Western blot

metoda imunoblot

Virusne okužbe, ki jih lahko diagnosticiramo na osnovi rezultatov seroloških preiskav

infekcijska mononukleoz (EBV)

klopni meningoencefalitis (virus KME)

hepatitis A (HAV)

hepatitis B (HBV)

hepatitis D (HDV)

hepatitis C (HCV) - deloma

hepatitis E (HEV)

okužba s HIV

rdečke

ošpice

Neposredno dokazovanje virusnih okužb

- morfološke metode
- osamitev virusa (celične kulture)
- dokazovanje virusnih antigenov
- molekularne metode

Molekularne virološke diagnostične metode

hibridizacijske metode

hibridizacija in situ, tekočinska hibridizacija

metode pomnoževanja nukleinskih kislin (amplifikacijske m)

PCR

PCR v realnem času

LCR

NASBA

določanje zaporedja nukleinskih kislin (sekveniranje)

Molekularne virološke diagnostične metode - področja uporabe

- dokazovanje virusne okužbe
(virusna nukleinska kislina je / ni v kužnini)
- določanje virusnega bremena
(količina virusne nukleinske kisline v bolnikovi krvi)
(HIV, HBV, HCV, CMV, EBV)
- genotipizacija virusa (HCV, HPV)
- ugotavljanje odpornosti virusa na protivirusna zdravila
(HIV, HBV, CMV)

Molekularne virološke diagnostične metode

nepogrešljive za spremljanje poteka in uspeha zdravljenja

- kroničnega hepatitisa B
- kroničnega hepatitisa C
- okužbe s HIV
- okužbe s CMV pri imunokompromitiranih bolnikih
- okužbe z EBV pri imunokompromitiranih bolnikih