

# Pomen mikrobiološke diagnostike: katere kužnine, kdaj; kako razumeti antibiogram

Podiplomski tečaj predpisovanja protimikrobnih zdravil  
za bolnišnične zdravnike  
Ljubljana, 16. - 18. 05. 2019



Katja Seme

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo  
UL MF

## Osnovni namen mikrobiološke diagnostike

- najti povzročitelja okužbe
- opredeliti uporabo ustreznega protimikrobnega zdravila

# 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

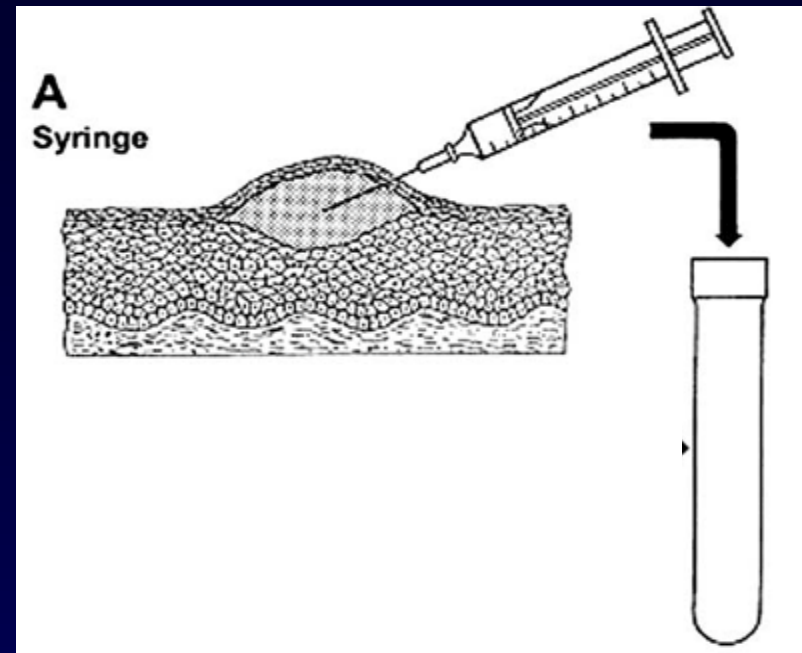
- ustrezna količina
- reprezentativen vzorec za določen vnetni proces
- preprečena možnost kontaminacije vzorca (sterilen pribor za odvzem, aseptični pogoji odvzema)
- takojšenj transport v laboratorij
- takojšnja obdelava v laboratoriju
- odvzem kužnine pred začetkom protimikrobnega zdravljenja

# 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,  
invazivno odvzeti vzorci

☹️ brisi



- omejen volumen
- onemogočen neposredni gramski razmaz
- enostavna kontaminacija
- konice brisov iz različnih materialov  
(ni vsak material primeren za vse preiskave)

# 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

nokardije, aktinomicete

*Bordetella pertussis*

borelije, leptospire, treponeme

erlihije, rikecije, anaplazme

*Tropheryma whipplei*

*Neisseria gonorrhoeae*



# 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 razmazov obarvanih po Gramu

- hitra, poceni in relativno enostavna bakteriološka metoda
- omejena občutljivost ( $\geq 10^5$  bakterijskih celic/ml kužnine)
- vse patogene bakterije se ne obarvajo po Gramu  
(npr. mikobakterije, mikoplazme, klamidije, rikecije, erlihije, treponeme)
- omejena natančnost/ločljivost

# Hitri antigeni testi v bakteriologiji

dokaz bakterijskih antigenov v kužnini s pomočjo znanih specifičnih protiteles

*Streptococcus pyogenes* (bris žrelca)

*Streptococcus pneumoniae* (urin, likvor)

*Legionella pneumophila* (urin)

*Clostridium difficile* (blato)

# Molekularno dokazovanje bakterij neposredno v kužnini

- počasi rastoče patogene bakterije  
(npr. mikobakterije, *Bordetella pertussis*, borelije)
- patogene bakterije za katere rutinsko ni treba določati občutljivosti za antibiotike (npr. klamidije, mikoplazme, legionele, *B. pertussis*)
- patogene bakterije, ki jih ni mogoče ali jih je težko gojiti v kulturi (npr. *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Tropheryma whippelii*)
- predhodno protibakterijsko zdravljenje  
(razlog za negativen rezultat kultivacije; primarno sterilne kužnine)

# Osamitev bakterijskega povzročitelja okužbe iz kužnine

- nacepitev



- inkubacija



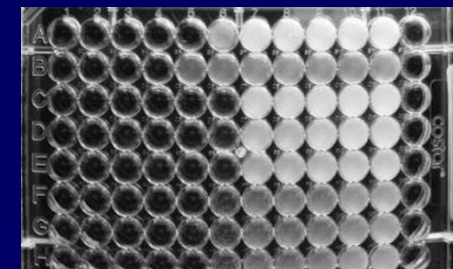
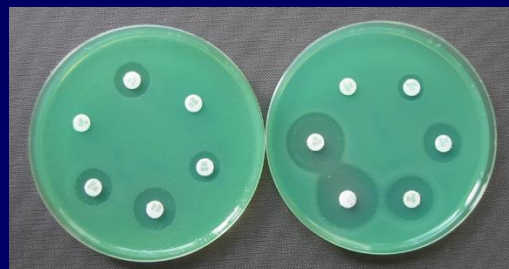
- odčitavanje



- identifikacija



- antibiogram



# Osamitev povzročitelja iz kužnine

- nacepitev vzorca



- inkubacija



1 dan

- odčitavanje



- identifikacija

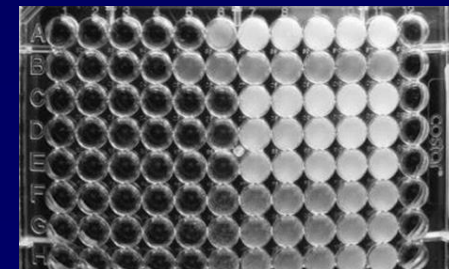


3 min-1h



1-2 dni

- antibiogram  
1 dan



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

vidne v mikroskopskem preparatu iz kužnine

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

rast na trdnem gojišču

$\geq 10$  bakterijskih celic / ml kužnine

rast v tekočem gojišču

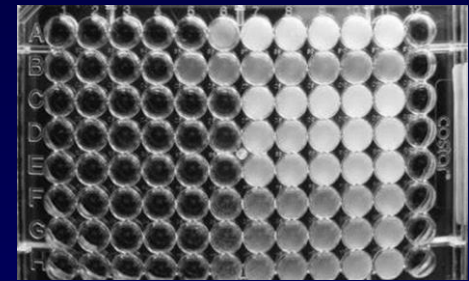


# Metode za določanje bakterijske občutljivosti

- disk difuzijska  
kvalitativen rezultat (S, I, R)



- dilucijske (makro-, mikro-, agar dilucijska)  
kvantitativen rezultat-MIK (S, I, R)



- gradient difuzijska / difuzija antibiotičnega gradienta  
(„E-test“)  
kvantitativen rezultat-MIK (S, I, R)





# Določanje občutljivosti za protimikrobna zdravila v skladu z navodili

EUCAST

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Slovenija od 01. 04. 2014

CLSI

Clinical and Laboratory Standards Institute

# EUCAST 2002-2018

## Pomen kategorij rezultatov testiranja bakterijske občutljivosti

### S - občutljiv

velika verjetnost uspešnega zdravljenja

### R - odporen

velika verjetnost neuspešnega zdravljenja

### I - intermediaren - učinek zdravljenja je negotov

1. zdravljenje bo morda uspešno, če se zdravilo na mestu okužbe koncentrira ali če lahko uporabimo velik odmerek zdravila;
2. upoštevanje tehnične negotovosti - vmesno območje, ki preprečuje vpliv nekontroliranih tehnični dejavnikov na interpretacijo rezultata

# EUCAST 2019

## Pomen kategorij rezultatov testiranja bakterijske občutljivosti

### S - občutljiv, standardni režim odmerjanja

velika verjetnost uspešnega zdravljenja z uporabo standardnega režima odmerjanja

### I - občutljiv, povečana izpostavljenost

velika verjetnost uspešnega zdravljenja, ker je izpostavljenost povzročitelja okužbe zdravilu povečana zaradi prilagojenega režima odmerjanja ali zaradi koncentracije zdravila na mestu okužbe

### R - odporen

velika verjetnost, da zdravljenje ne bo uspešno, čeprav je izpostavljenost zdravilu povečana

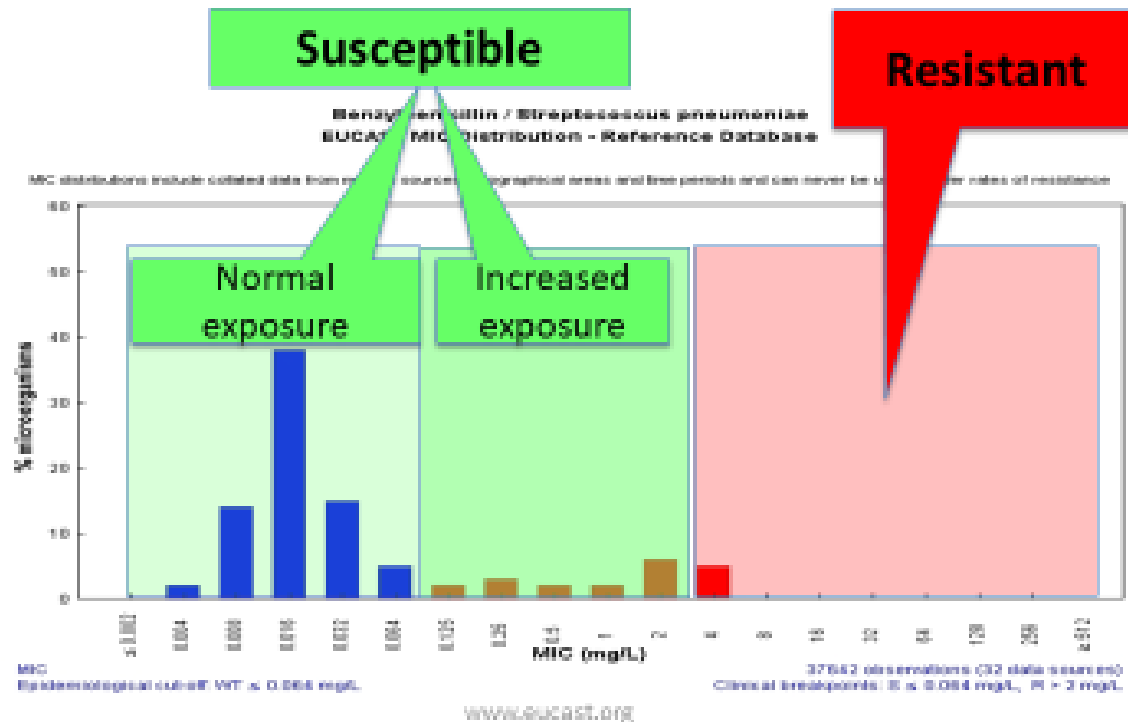
# EUCAST 2019

## Pomen kategorij rezultatov testiranja bakterijske občutljivosti

Izpostavljenost povzročitelja okužbe protimikrobnemu zdravilu na mestu okužbe je odvisna od načina dajanja, odmerka, odmernega intervala, trajanja infuzije, razporeditve, presnove in izločanja zdravila.

Izpostavljenost povzročitelja okužbe protimikrobnemu zdravilu na mestu okužbe povečamo s prilagoditvijo režima odmerjanja, načina dajanja, ali ker se zdravilo naravno koncentrira na mestu okužbe.

# SIR - new definitions 2019



edina razlika med "S" in "I" je v količini zdravila, ki je potrebna na mestu okužbe, da dosežemo ustrezen klinični odziv

# EUCAST 2019

## Odmerjanje

EUCAST navaja „standardne“ in „velike“ dnevne odmerke antibiotika na osnovi katerih so določene klinične mejne vrednosti za opredeljevanje rezultatov testiranja občutljivosti

<http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/dokumenti/OsnoveantibiogramaposmernihEUCAST1.izdajaapril2019.pdf>

[http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)

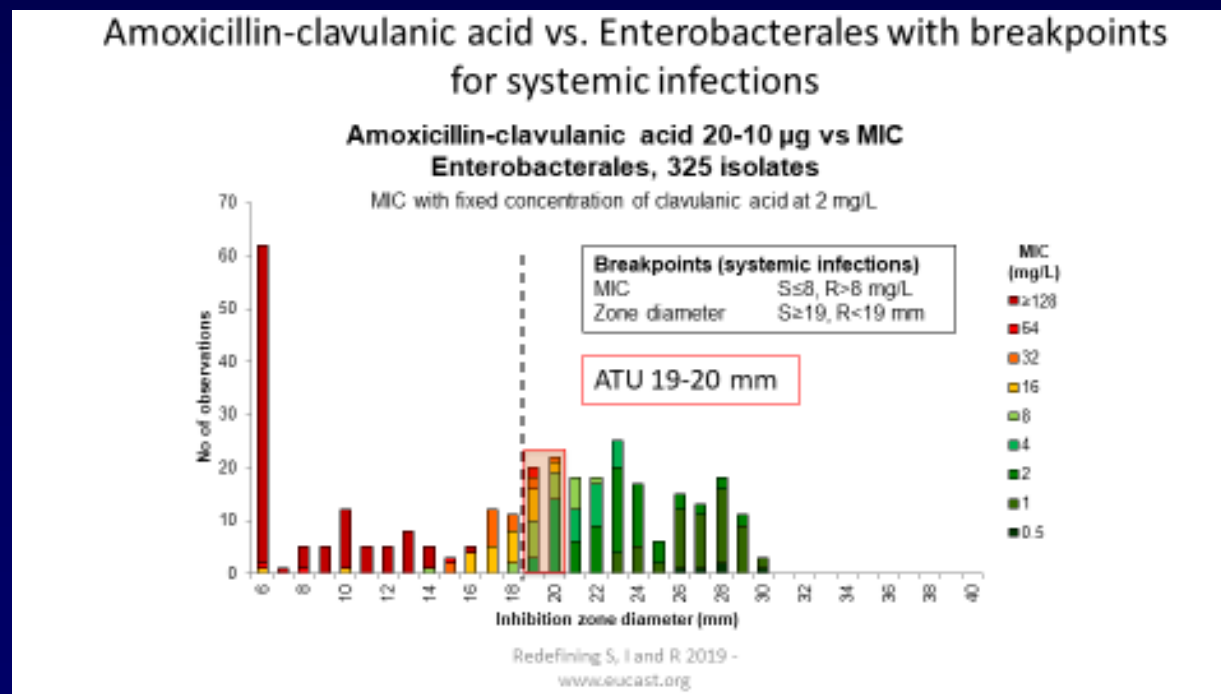
Ti odmerki so samo orientacija za odmerjanje v klinični praksi in ne nadomeščajo lokalnih, nacionalnih ali regionalnih smernic za odmerjanje antibiotikov.

Odmerek za posameznega bolnika je potrebno prilagoditi lastnostim bolnika, izolatu, rezultatu antibiograma (če ga imamo) in vrsti/mestu okužbe.

# EUCAST 2019

## Področje tehnične negotovosti

vpliv nekontroliranih tehnični dejavnikov NI več zajet v kategoriji I  
v redkih kombinacijah bakterija/antibiotik, v določenem območju rezultatov, zaradi izvedbenih omejitev metode ne moremo zanesljivo opredeliti rezultata - EUCAST težavo identificira in poimenuje področje tehnične negotovosti (*Area of Technical Uncertainty, ATU*)



# EUCAST 2019

## Področje tehnične negotovosti

ATU - rezultat testiranja je v tem primeru nezanesljiv

laboratorij v primeru ATU lahko za odpravo tehnične negotovosti uporabi alternativno metodo (npr. dilucijsko metodo namesto difuzijske)

če alternativna metoda ni smiselna, ali tudi z uporabo alternativne metode rezultat ostane v področju ATU, dobljeni kategoriji za antibiotik dodamo zvezdico ( $S^*/I^*/R^*$ ), ki označuje, da gre za področje tehnične negotovosti - nezanesljiv rezultat



# EUCAST

## Opombe rezultatov testiranja bakterijske občutljivosti

opombe so sestavni del rezultata

pojasnila, opozorila, navedbe omejitev

prenosljivost rezultata testiranega antibiotika na druge antibiotike

omejitve za določene vrste okužb (sečni mehur, osrednje živčevje)

omejitve za določen način dajanja zdravila (razlike pri po in iv)

opozarjajo na mnogo večja možnost razvoja odpornosti kot običajno

opozarjajo na potrebo po velikem odmerku

pojasnjujejo mehanizem odpornosti (MRSA, VRE, iMLSb, ESBL, CRE, CPE, ...)

**Rezultat 1. Staphylococcus aureus 3+**

Tg (tekoče gojišče), 1+ (malo), 2+ (zmerno), 3+ (veliko), 4+ (zelo veliko), CFU (število kolonijskih enot)

	1.
penicilin	R
oksacilin	S
vankomicin	S
	1
teikoplanin	S
	1
gentamicin	S
eritromicin	S
klindamicin	S
tetraciklin	S
ciprofloksacin	S
trimetoprim+sulfametoksazol	S
rifampin	S

Legenda za tabelo:

(S) - OBČUTLJIV

(R) - ODPOREN

ŠTEVILČNI REZULTAT - MIK (mg/L)

Pojasnila so v dokumentu: Osnove antibiograma po smernicah EUCAST, <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz>**Komentar za izolat 1**

**oksacilin**; stafilokoki, občutljivi za **oksacilin**/cefoksitin, so občutljivi tudi za druge **antistafilokokne peniciline** ( kloksacilin, flukloksacilin), za **peniciline z inhibitorji betalaktamaz**, za **karbapeneme** ter za **cefalosporine**; izjema so ceftazidim, cefiksime, ceftibuten in ceftolozan s tazobaktamom, ceftazidim z avibaktamom, ki niso uporabni za zdravljenje stafilokoknih okužb. Za **cefaklor**, **cefotaksim** in **ceftriakson** uporabljamo **le veliki odmerki**.

**eritromicin**: rezultat velja tudi za azitromicin, klaritromicin in roksitromicin.

**tetraciklin**: izolat je občutljiv tudi za doksiciklin in minociklin.

**ciprofloksacin**; uporabljamo **le veliki odmerki**.

**rifampin**: ne uporabljamo za zdravljenje stafilokoknih okužb v monoterapiji, ker se hitro razvije odpornost.

Urinokultura - kvantitativno

**Rezultat** 1. *Escherichia coli* 1.000.000 CFU/ml

	1.
ampicilin	R
amoksisicilin+klavulanska kislina - U	S
amoksisicilin+klavulanska kislina	R
piperacilin+tazobaktam	S
cefuroksim - oralni	S
cefuroksim - parenteralni	S
cefiksim	S
cefotaksim	S
ceftazidim	S
cefepim	S
imipenem	S
ertapenem	S
gentamicin	S
amikacin	S
norfloksacin	S
ciprofloksacin	S
levofloksacin	S
nitrofurantoin	S
trimetoprim+sulfametoksazol	S

Legenda za tabelo:

(S) - OBČUTLJIV

(R) - ODPOREN

Pojasnila so v dokumentu: Osnove antibiograma po smernicah EUCAST, <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz>

**Komentar za izolat 1**

**ampicilin:** rezultat velja tudi za amoksisicilin.

**amoksisicilin+klavulanska kislina - U:** rezultat velja samo za nezapletene okužbe sečil.

**cefuroksim - oralni:** rezultat velja samo za nezapletene okužbe sečil.

**cefuroksim - parenteralni;** uporabljamo **le veliki odmerek.**

**cefiksim:** rezultat velja samo za nezapletene okužbe sečil.

**gentamicin;** uporabljamo **le veliki odmerek.**

**amikacin;** uporabljamo **le veliki odmerek.**

**norfloksacin:** rezultat velja samo za nezapletene okužbe sečil.

**nitrofurantoin:** rezultat velja samo za nezapletene okužbe sečil.

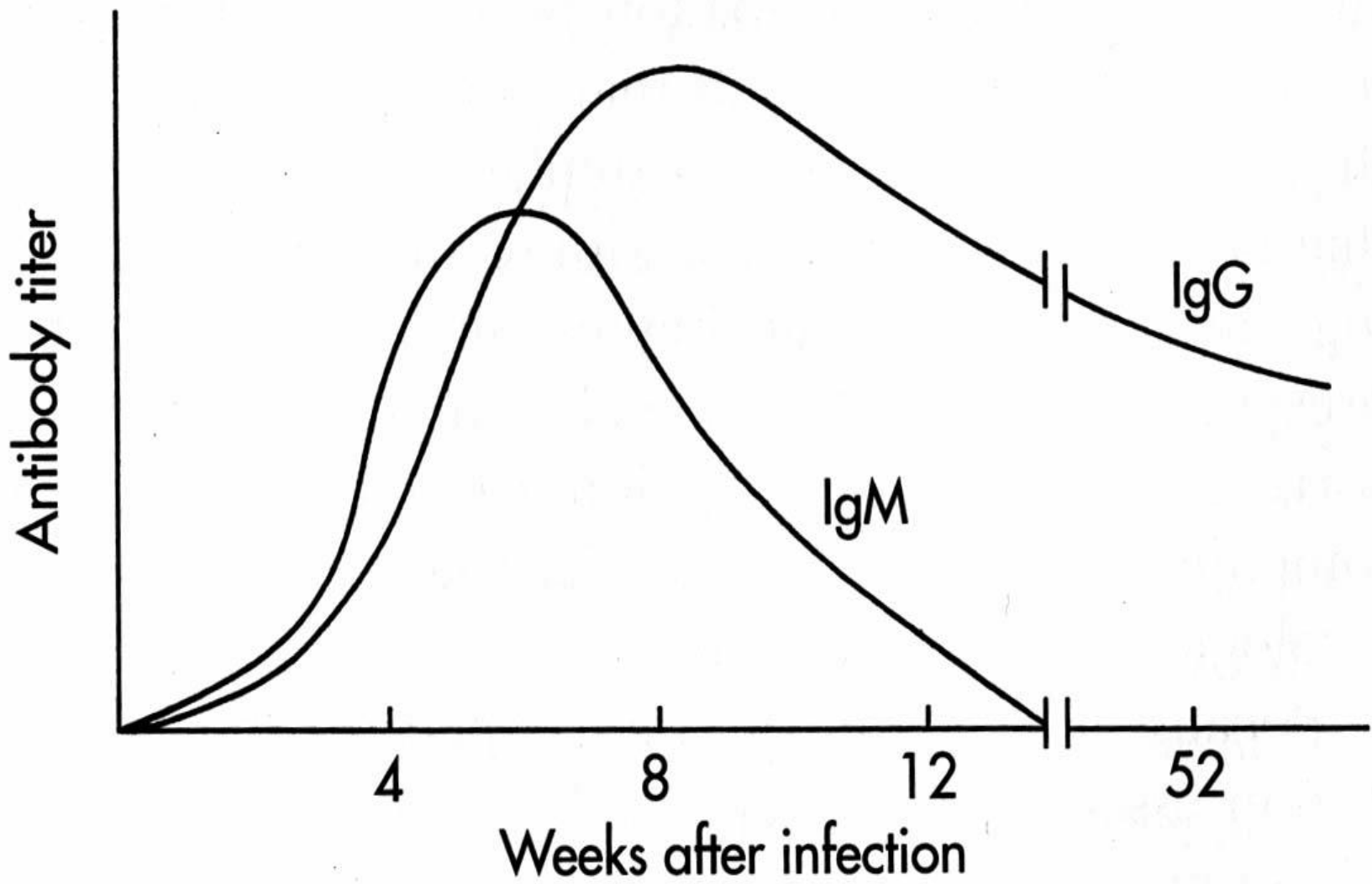
# Diagnostika virusnih okužb

## NEPOSREDNA

- morfološke metode
- osamitev virusa
- dokazovanje virusnih antigenov
- molekularne metode

## POSREDNA

- dokaz specifičnih protiteles proti virusnim antigenom v bolnikovem serumu



# Posredno dokazovanje virusnih okužb ("serologija")

specifična protitelesa v bolnikovem serumu / slini

zanesljiva potrditev akutne okužbe:

prisotnost specifičnih protiteles IgM

serokonverzija ali

pomemben porast koncentracije IgG

(testiranje parnih serumskih vzorcev)

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

infekcijska mononukleozna (EBV)

klopni meningoencefalitis (virus KME)

hepatitis A (HAV)

hepatitis B (HBV)

hepatitis D (HDV)

okužba s HIV

rdečke

ošpice

mumps

# Neposredna diagnostika virusnih okužb

Ali je virus X v kužnini?

Koliko virusa X je v kužnini?



# Kužnine za neposredno diagnostiko virusnih okužb

kri (serum, plazma, polna kri)

likvor

urin

blato

aspirati

izpirki

sputum

tkivni vzorci

brisi (transportno gojišče za viruse !!!)

# 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, HCV)

# Sindromska mikrobiološka diagnostika

hkratno zaznavanje več različnih mikrobnih povzročiteljev okužbe z enim samim molekularnim diagnostičnim testom

takšen diagnostični test je lahko zelo koristen pri bolnikih s kliničnimi infekcijskimi sindromi, ki jih lahko povzroči več različnih vrst patogenov:

sepsa (pozitivne hemokulture)  
okužba osrednjega živčevja (likvor)  
okužbe dihal (vzorci iz dihal)  
infekcijska driska (blato)

## Syndromic Panel-Based Testing in Clinical Microbiology

Poornima Ramanan,<sup>a</sup> Alexandra L. Bryson,<sup>a</sup> Matthew J. Binnicker,<sup>a</sup> Bobbi S. Pritt,<sup>a,b</sup> Robin Patel<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Division of Clinical Microbiology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA

<sup>b</sup>Division of Infectious Diseases, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA *Clin Microbiol Rev* 2018; 31: pii: e00024-17