



Mikrobiološka diagnostika: kdaj, kaj, kako

doc. dr. Mateja Pirš, dr. med.

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani





Odvzem vzorcev - pravila

- Odvzem **pravega vzorca za pravo preiskavo ob pravem času**
- Če je le mogoče odvzem vzorca **pred začetkom antibiotičnega zdravljenja** (kultivacija!)
- Odvzem **dovolj velike količine vzorca** (likvor!)
- Preprečevanje **kontaminacije**
- Uporaba pravile **embalaže**
- Obvezno označevanje vzorcev
- natančno izpolnjen **spremni list**
- Čimprejšnji **transport** v laboratorij pod ustreznimi pogoji
- **KOMUNIKACIJA** s kliničnim mikrobiologom in laboratorijem!

**INŠTITUT ZA MIKROBIOLOGIJO
IN IMUNOLOGIJO**

Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani
Zaloška 4, 1000 Ljubljana
tel.: 01/543 74 00
fax: 01/543 74 01, www.imi.si

Številka naročila



IMI16101301



Datum in ura sprejema

SPREMNI LIST ZA MIKROBIOLOŠKE IN IMUNOLOŠKE PREISKAVE

Naziv in naslov zdravstvene organizacije - oddelek (žig)

Podatki o preiskovancu (nalepka)

Priimek in ime

Spol M Ž

Datum rojstva

Bivališče in poštna številka

KZZ

EMŠO

Matična številka preiskovanca

Datum sprejema v bolnišnico

Stroškovno mesto / RN

Telefon zdravnika / kontakta

VZOREC / KUŽNINA

Vrsta, mesto odvzema _____ Datum in ura odvzema _____

NAROČENE PREISKAVE (katalog preiskav je na www.imi.si / diagnostična dejavnost)**KLINIČNI IN DRUGI POMEMBNI PODATKI**

Klinična diagnoza

Pričetek/dan bolezni _____

Klinični znaki / simptomi _____ Nosečnost _____

Protivnetna / imunosupresivna terapija _____ Potovanje (država) _____

Transplantacija _____ Drugo _____

PROTIMIKROBNA TERAPIJA

Pred odvzemom vzorca / kužnine _____ Po odvzemu vzorca / kužnine _____

REZULTATI PREJŠNJIH PREISKAV

Kraj

Datum

Podpis, šifra in žig zdravnika



Telefon zdravnika / kontakta

Datum sprejema v bolnišnico

VZOREC / KUŽNINA

Vrsta, mesto odvzema

Si - periferija

Datum in ura odvzema



20/B2/

NAROČENE PREISKAVE (katalog preiskav je na www.imi.si / diagnostična dejavnost)

hemokultura 2x (HK 1 iz HD katetra - 740 ✓
HK 2 iz periferije) - 750 ✓

KLINIČNI IN DRUGI POMEMBNI PODATKI

Klinična diagnoza

S. aureus sepsis

Pričetek/dan bolezni

Klinični znaki / simptomi

Nosečnost

Protivnetna / imunosupresivna terapija

Potovanje (država)

Transplantacija

Drugo

Kol HD



20/B2/

PROTIMIKROBNA TERAPIJA

Pred odvzemom vzorca / kužnine

Mudox 2000

Po odvzemu vzorca / kužnine

ff

REZULTATI PREJŠNJIH PREISKAV

Kraj

ff

Datum

26.5.20

Podpis, šifra in žig zdravnika

[Redacted signature]



Telefon zdravnika / kontakta

Datum sprejema v bolnišnico

VZOREC / KUŽNINA

Vrsta, mesto odvzema

Datum in ura odvzema

NAROČENE PREISKAVE (katalog preiskav je na www.imi.si / diagnostična dejavnost)

KLINIČNI IN DRUGI POMEMBNI PODATKI

Klinična diagnoza

Klinični znaki / simptomi

Protivnetna / imunosupresivna terapija

Transplantacija

Prič

Nos

Potr

Drugo



PROTIMIKROBNA TERAPIJA

Pred odvzемом vzorca / kužnine

Prič



REZULTATI PREJŠNJIH PREISKAV

Kraj

Datum

Podpis, šifra in žila zdravnika

25.5

[Redacted signature and stamp]



Način odvzema kužnin za mikrobiološko preiskavo

- Z obrisanjem vnetih predelov (npr. bris žrela)
- S postrganjem epitelijskega tkiva (npr. sečnice, mehurčkov na koži)
- Z izkašljanjem/aspiracijo izločka dihal
- S prostim mokrenjem ali defekacijo
- S punkcijo (eksudat, kri, likvor, gnoj)
- S kirurškim posegom (odzem koščkov tkiva, biopsija)



Tkivo, telesne tekočine, invazivno odvzeti vzorci



Brisi (bakteriološke preiskave)

- omejen volumen
- enostavna kontaminacija
- za neposreden pregled razmaza **2 brisa !!!**
- Različni materiali konic (vpliv na preiskavo)
- Vpliv transportnih gojišč



Bris za preiskavo
na viruse (pr. VZV)



Bris za preiskavo
na patogene bakterije



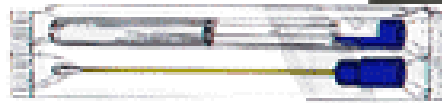
Kam shranjujemo odvzete kužnine?

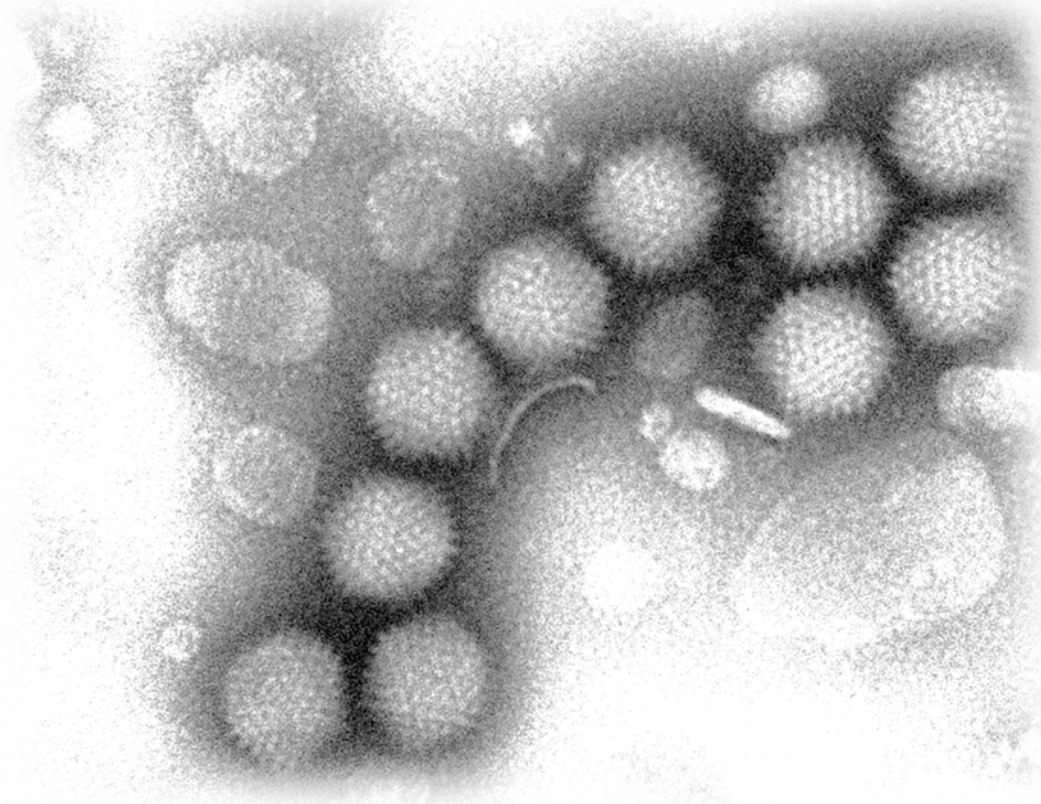
- V sterilne posodice, lončke, epruvete
- Direktno v gojišča za kultivacijo (hemokultura)
- Transportna gojišča (za anaerobe, za viruse, klamidije,...)



Kako transportiramo kužnine?

- Čim hitreje (do 2 uri/do 24 ur)
- Pomembna ustrezna temperatura
 - sobna T, telesna T, hladilna torba/4°C, suhi led
- Kužnino vedno spremlja Spremni list s podatki o bolniku in obolenju, kužnini, željeni preiskavi in pošiljatelju s kontaktno telefonsko številko





DIAGNOSTIKA VIRUSNIH OKUŽB

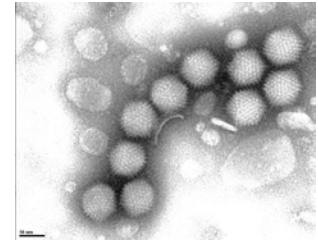


Razlogi za diagnostiko virusnih okužb

- Etiološka potrditev bolezni zaradi možnosti specifičnega zdravljenja
- Etiološka potrditev zaradi nadzora bolnišničnih okužb
- Dokazovanje/preverjanje imunskega statusa
- Epidemiološko spremljanje okužb

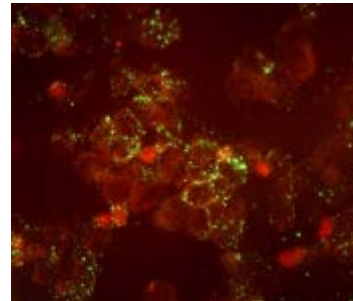
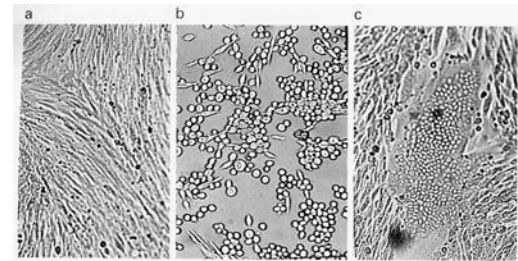


Diagnostika virusnih okužb



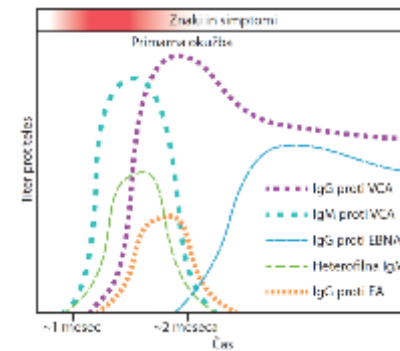
NEPOSREDNA DIAGNOSTIKA:

- **Direktne mikroskopske preiskave**
 - Elektronska mikroskopija - samo v kužninah z visoko koncentracijo virusov ($> 10^6$ virusov/ml) → blato, mehurčaste kožne lezije
- **Kultivacija & identifikacija povzročitelja**
 - NE v rutinski klinični diagnostiki
- **Direktna detekcija antigenov**
- **Dokaz genoma (DNA/RNA)**
 - Samo specifični testi!



POSREDNA DIAGNOSTIKA

- Dokaz imunskega odgovora - „serologija“





Diagnostika virusnih okužb: neposredna diagnostika

- **Ali je prisoten virus XY?**
 - virusna nukleinska kislina je/ni v kužnini
- **Koliko je virusa XY v kužnine?**
 - Določanje virusnega bremena – količina virusne nukleinske kisline v kužnini (HIV, HBV, HCV, CMV, EBV)
- **Genotipizacije virusov (HCV, HPV)**
- **Ugotavljanje odpornosti virusa na protivirusna zdravila (HIV, HBV, HCV, CMV)**
- **Kužnine:**
 - Kri (serum, plazma, polna kri)
 - Likvor
 - Urin
 - Blato
 - Izpirki
 - Kužnine spodnjih dihal
 - Vzorci tkiva
 - Brisi (+transportno gojišče za viruse!)

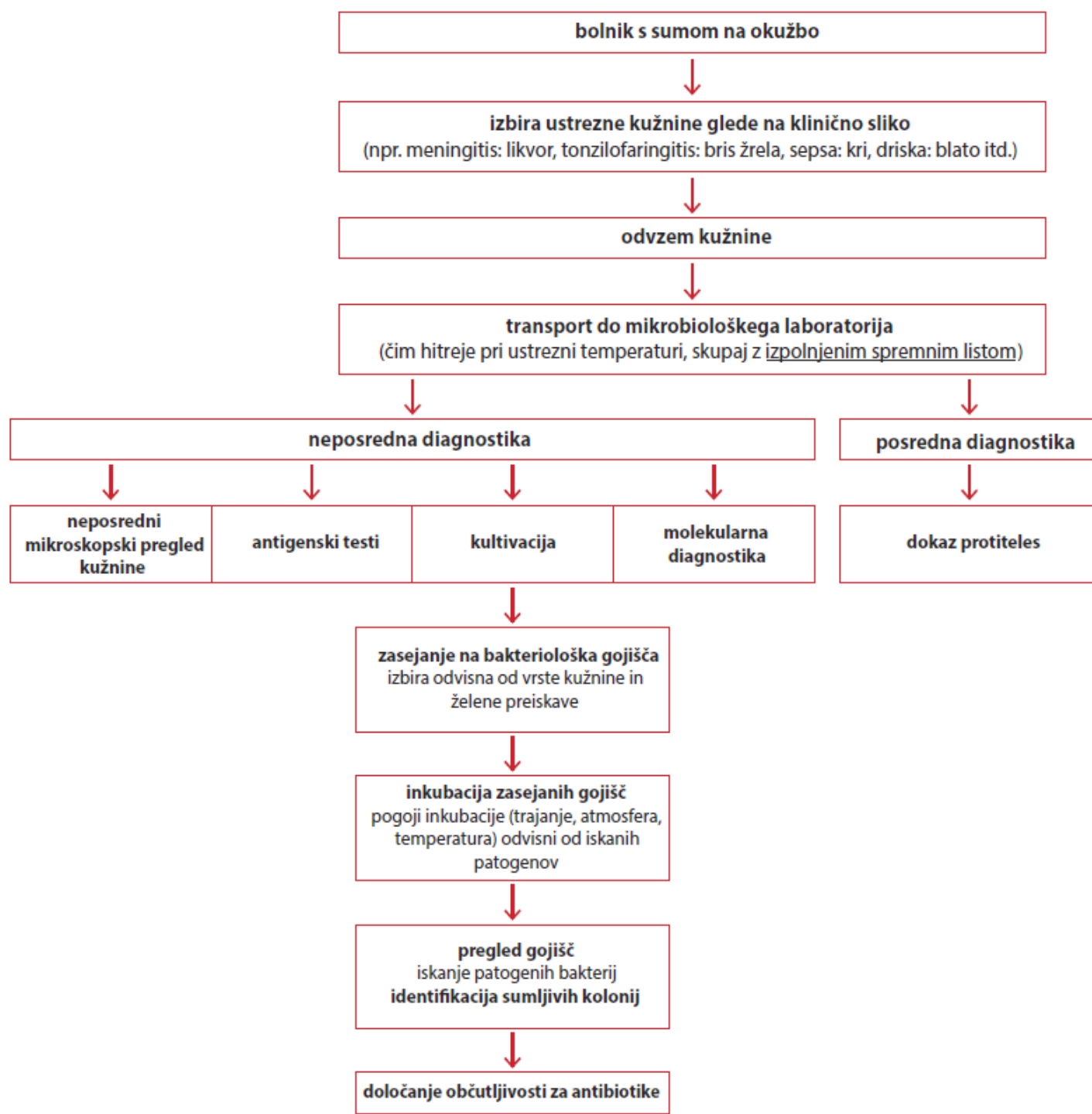


Diagnostika virusnih okužb: posredna diagnostika

- „serologija“
 - Specifična protitelesa v bolnikovem serumu (slini)
 - potrditev akutne okužbe:
 - prisotnost specifičnih protiteles IgM
 - serokonverzija ali
 - pomemben porast koncentracije IgG (parni vzorci!)
- Pomembno v diagnostiki okužb z:**
- infekcijska mononukleoz (EBV)
 - klopni meningoencefalitis(virus KME)
 - hepatitis A(HAV)
 - hepatitis B(HBV)
 - hepatitis D (HDV)
 - okužba s HIV
 - rdečke
 - ošpice
 - mumps



DIAGNOSTIKA OKUŽB Z BAKTERIJAMI IN GLIVAMI





- **Katere patogene bakterije so v kužnine?**
 - Preiskava na „patogene bakterije“

 - **Ali je bakterija XY v kužnini?**
 - ciljane preiskave na točno določenega bakterijskega povzročitelja
-
- Kombinacija VZOREC + PREISKAVA opredeli nabor gojišč, pogoje kultivacije in trajanje preiskave



Pomembni patogeni, ki jih ne moremo dokazati s preiskavo na „patogene bakterije“

- Mikoplazme
- Klamidije
- Legionele
- Mikobakterije
- Nokardije, aktinomicete
- *Bordetella pertusis*
- Borelije, treponeme, leptospire
- Erlihije, rikecije, anaplazme
- *Tropheryma whipplei*
- *Neisseria gonorrhoeae*

Ciljane preiskave

- Specifična kultivacija
- PCR idr.



Diagnostika okužb z bakterijami in glivami: neposredna diagnostika - antigenski testi

- Možno pri posameznih bakterijah in glivah
- Dokaz bakterijskih antigenov neposredno v kužnini s pomočjo specifičnih protiteles:
 - **Hitri antigenski testi:**
 - *Streptococcus pyogenes* – bris žrela
 - *Streptococcus pneumoniae* – urin, likvor
 - *Legionella pneumophila* – urin
 - Toksin *Clostridioides difficile* – blato
 - **Antigenski testi:**
 - galaktomananski antigen - *Aspergillus* spp
 - β -D glukan – večina gliv (izjeme: zigomicete, *Cryptococcus* spp.)
 - *Cryptococcus neoformans* antigen
 - *Legionella pneumophila* – urin





Diagnostika okužb z bakterijami in glivami: neposredna diagnostika – molekularni testi

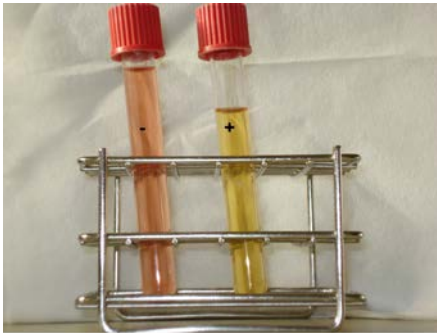
- **Počasi rastoče bakterije**
 - Mikobakterije, *Bordetella pertusis*, borelije
- **Patogene bakterije, ki so zahtevnejše za kultivacijo in rutinsko določanje občutljivosti ni nujno potrebno**
 - Klamidije, mikoplazme, legionele, *Bordetella pertusis*
- **Patogene bakterije, ki so zahtevne za kultivacijo oz. jih ni mogoče kultivirati**
 - Rikecije, erlihije, *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Tropheryma whipplei*



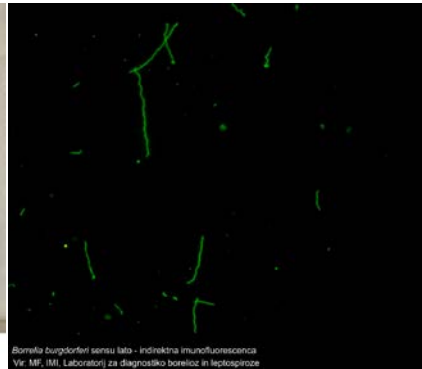
Diagnostika okužb z bakterijami in glivami: neposredna diagnostika – molekularni testi

- **Bakterije: detekcija 16S podenote bakterijskega ribosoma in sekvenciranje**
- **Glive: detekcija ITS regije ribosomalnega operona gliv in sekvenciranje**
 - „nespecifična“ molekularna preiskava
 - Primerna za primarno sterilne kužnine
 - Postopek daljši
 - Predhodno zdravljenje z antibiotiki
 - Lahko neuspešna kultivacija
 - Ni podatka o občutljivosti za antibiotike!

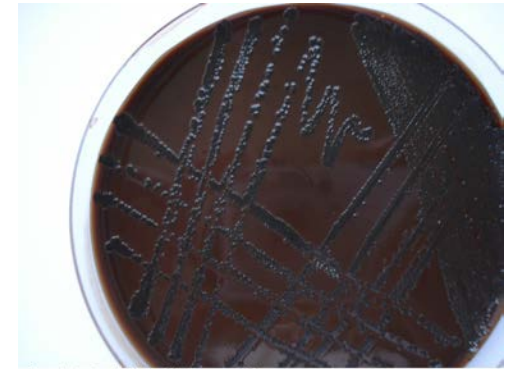
Diagnostika okužb z bakterijami in glivami: specifična kultura



Borrelia burgdorferi sensu lato - modificirano Kelly Pettenkofer gojišče
Vir: MF, IMI, Laboratorij za diagnostiko borelioz in leptospiroze



Borrelia burgdorferi sensu lato - indirektna imunofluorescenca
Vir: MF, IMI, Laboratorij za diagnostiko borelioz in leptospiroze



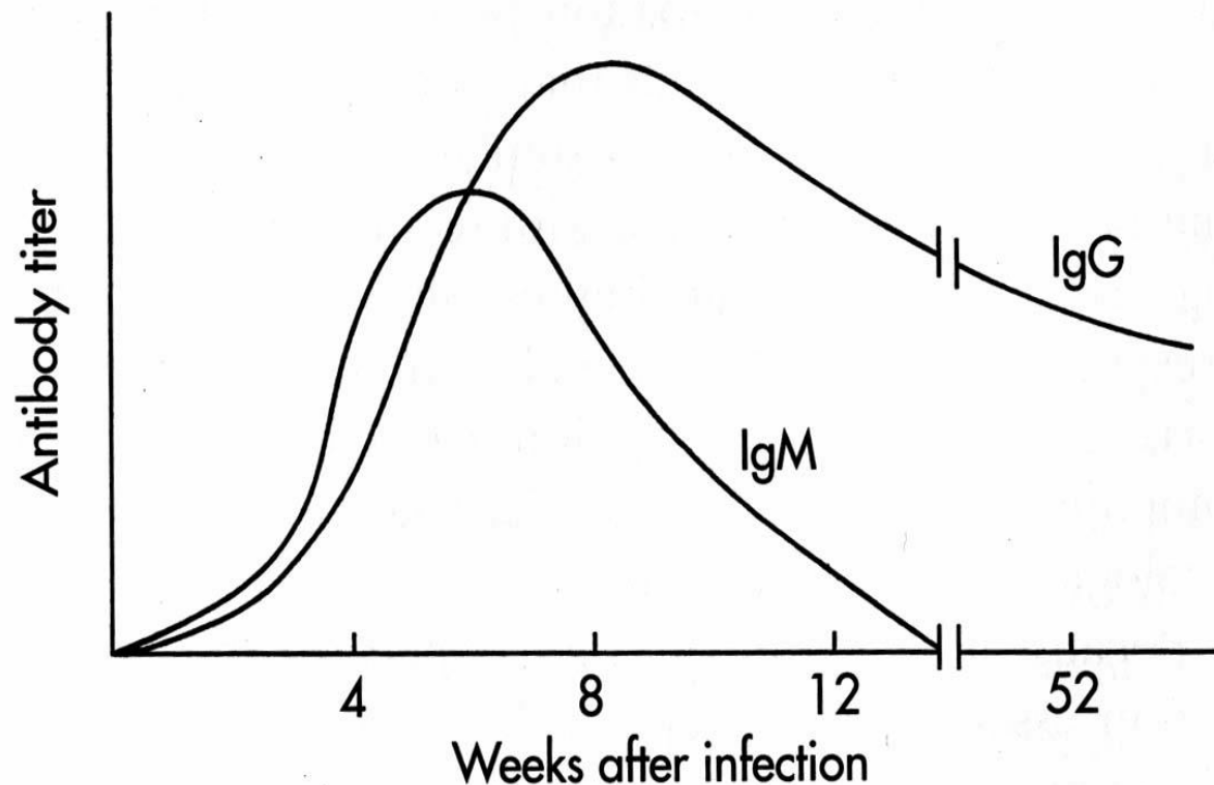
Corynebacterium diphtheriae - Claubergovo gojišče
Vir: MF, IMI





Diagnostika okužb z bakterijami in glivami: posredna diagnostika

- Dokaz imunskega odgovora na antigene patogenih bakterij in gliv – „serologija“





PREISKAVA NA PATOGENE BAKTERIJE IN GLIVE



Preiskava na patogene bakterije in glive

$\geq 10^5$ 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



Preiskava na patogene bakterije in glive: neposredni mikroskopski pregled

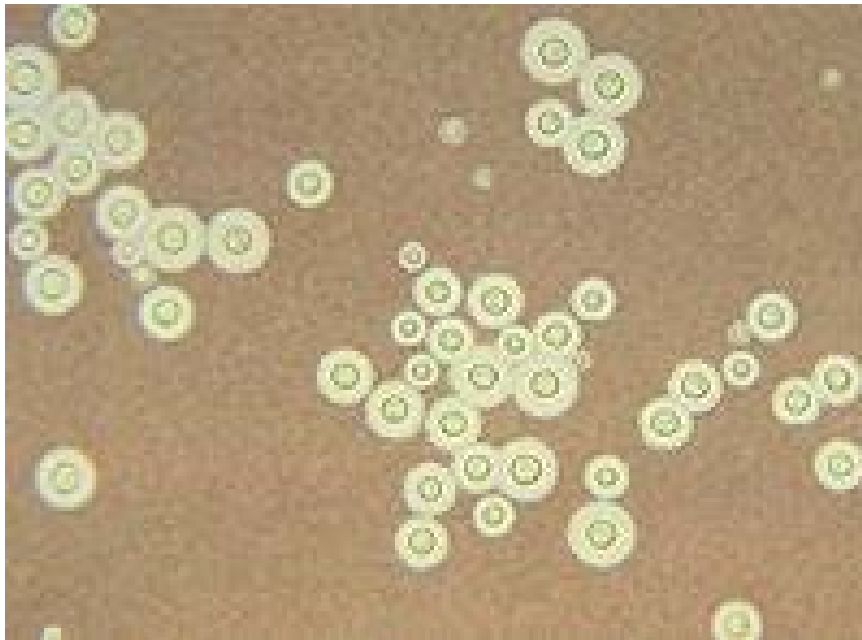
BARVANJE PO GRAMU:

- Kdaj: likvor, druge primarno sterilne kužnine
kužnine spodnjih dihal (AT/BAL/sputum)
- prvi presejalni korak, ki lahko usmeri diagnostiko → hitri in poceni rezultati
→ lahko pomagajo usmeriti antibiotično zdravljenje
 - različna sestava celične stene bakterij GP in GN bakterij & morfološki podatki → razlike v pričakovani občutljivosti za antibiotike (naravna odpornost!)
- Omejitve:
 - omejena natančnost in ločljivost
 - nekateri mikroorganizmi se ne obarvajo po Gramu (mikobakterije, klamidije, treponeme...)
 - mikroorganizmi so lahko neviabilni ali pa se niso (več) sposobni razmnoževati → dokončna informacija po končani kultivaciji

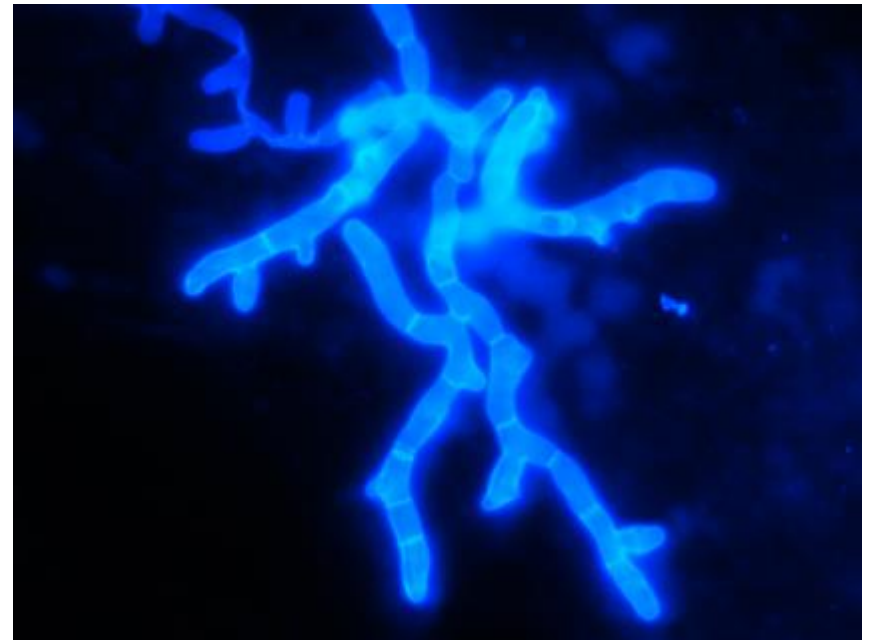


Preiskava na patogene bakterije in glive: neposredni mikroskopski pregled

GLIVE: INDIJSKO ČRNILO



GLIVE: CALCOFLUOR WHITE

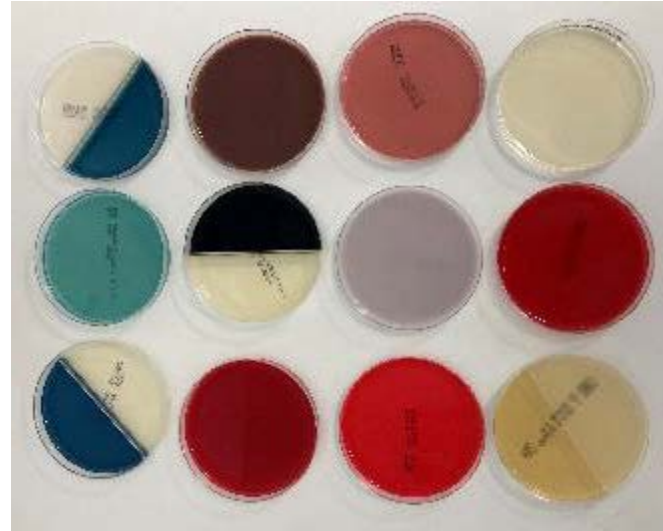




Preiskava na patogene bakterije in glive: osamitev na gojiščih

NACEPITEV & INKUBACIJA

- Gojišča – trdna in/ali tekoča
 - Bogatitvena
 - Diferencialna
 - Kromogena...



- Pogoji za rast – hranila, temperatura, atmosfera (zrak, CO₂, anaerobno...)



Izbor gojišč & način in trajanje kultivacije je odvisen od kužnine, preiskave in iskanih patogenov

- Inkubacija – večinoma 1-2 dni (tudi 5 dni in več)

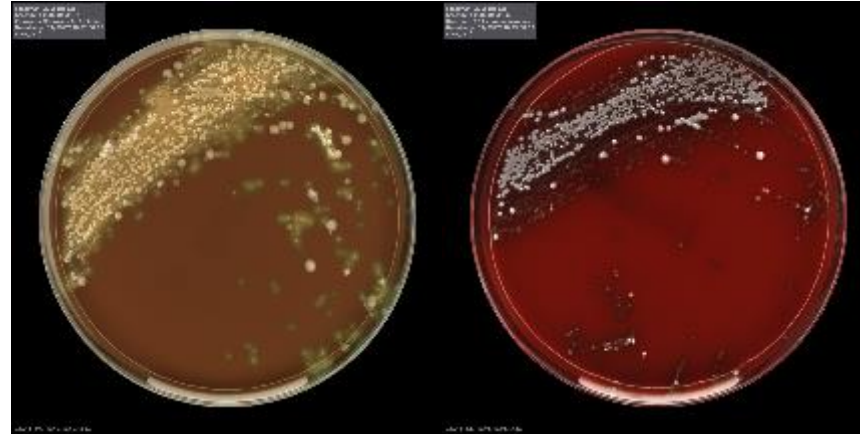




Preiskava na patogene bakterije in glive: osamitev na gojiščih

ODČITAVANJE

- dnevno pregledovanje
- Izolacija čiste kulture



Delni izvid

Vzorec: **Kri - gojišče BACTEC I** (Odvzeto 09.09.2020 ob 20:15)

V direktnem preparatu iz pozitivne hemokulture, obarvanem po Gramu, smo videli po Gramu negativne bacile.

Aerobna hemokultura

Rezultat 1. *Escherichia coli*

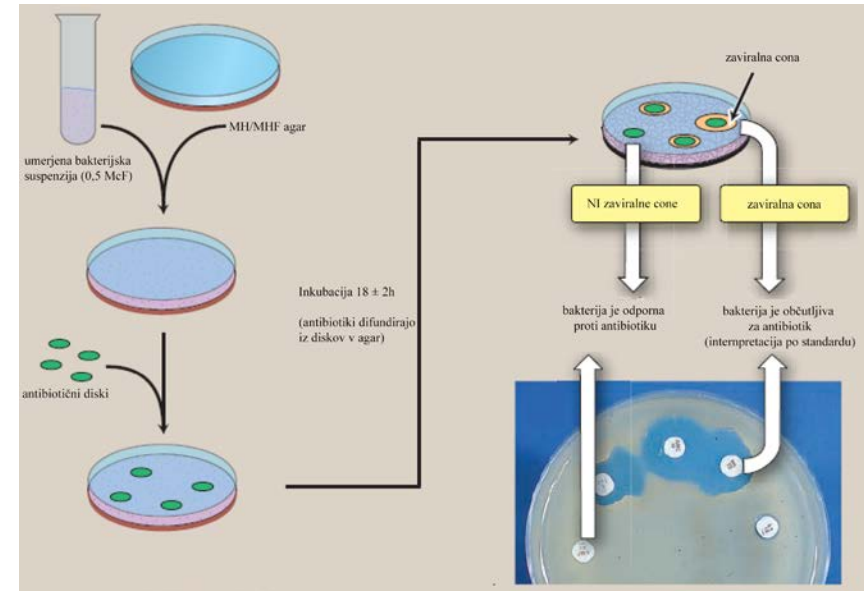
Anaerobna hemokultura: ZAENKRAT NI RASTI. Preiskava še ni končana.



Preiskava na patogene bakterije in glive: določanje občutljivosti za antibiotike

DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE

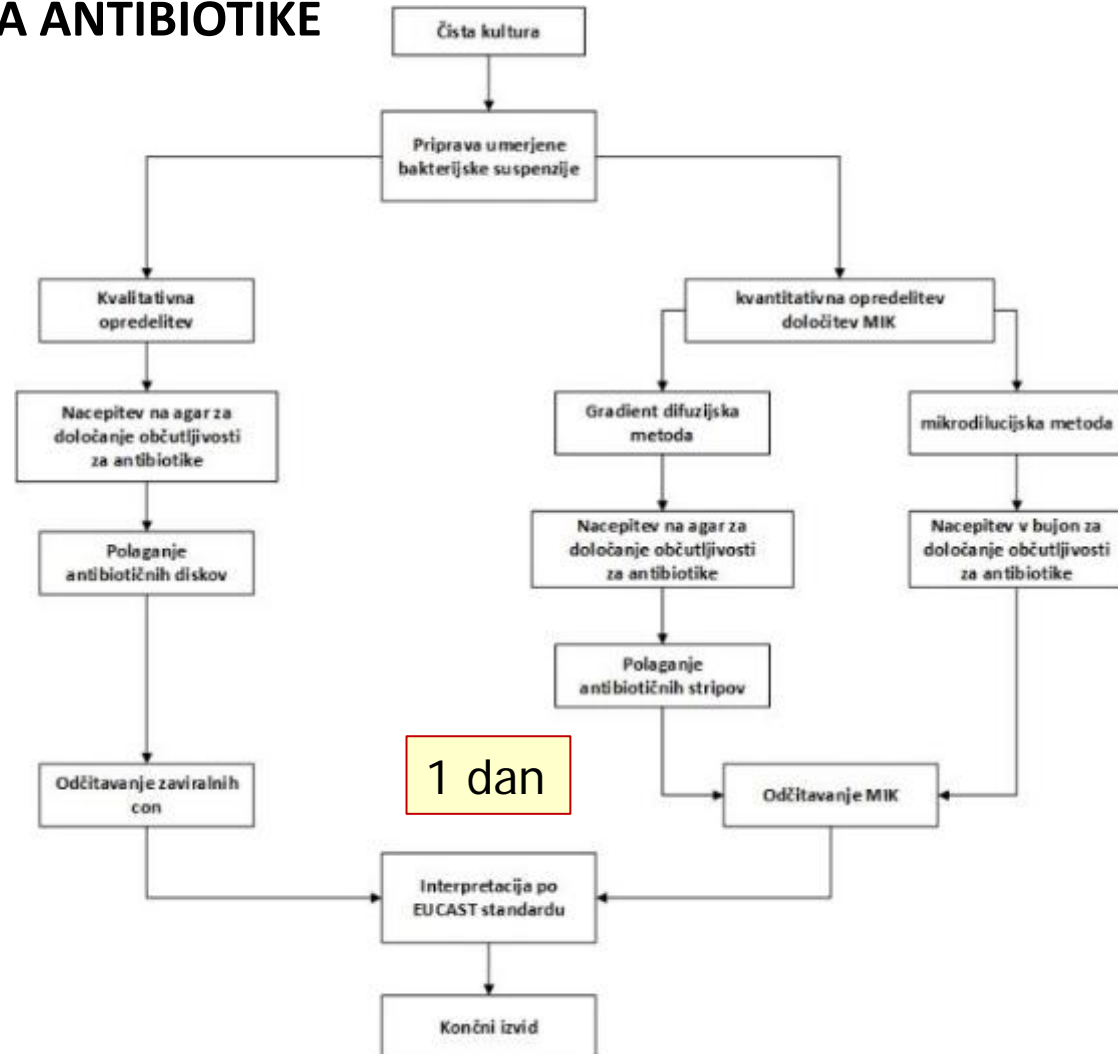
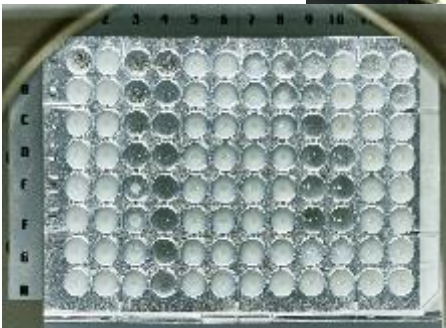
- **FENOTIPSKO TESTIRANJE**
- Standardizirano testiranje – EUCAST
 - Gojišče, atmosfera, temperatura, trajanje
- Standardizirana interpretacija – EUCAST
 - Klinične kategorije! S/I/R
- Nabor antibiotikov: odvisen od bakterijske vrste, osnovni nabor določen na SKUOPZ





Preiskava na patogene bakterije in glive: osamitev na gojiščih

DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE

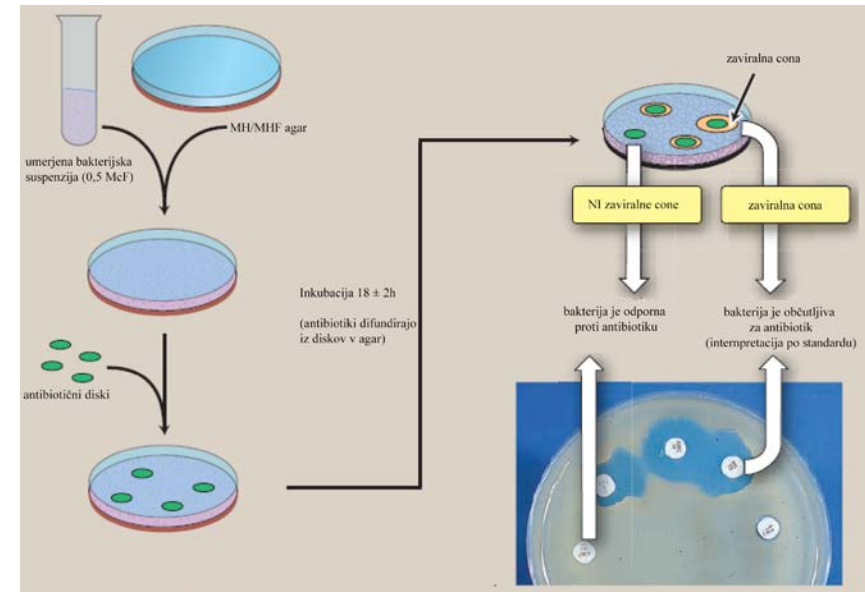




Preiskava na patogene bakterije in glive: določanje občutljivosti za antibiotike

DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE

- **Prednosti:**
 - sočasno testiranje različnih antibiotičnih kategorij,
 - neodvisnost od osnovnih meh.odpornosti
 - rezultat kategoriziramo na podlagi smernic → opredelimo ali lahko pričakujemo klinični odziv na zdravljenje.
- **Slabosti:**
 - odvisnost od hitrosti rasti bakterij, hitrosti izražanja mehanizmov odpornosti
 - hitrost rasti odpornih sevov v primeru sočasne prisotnosti občutljivih in odpornih sevov iste vrste.
 - Redko uporabljeni antibiotiki niso v naboru





Preiskava na patogene bakterije in glive: določanje občutljivosti za antibiotike

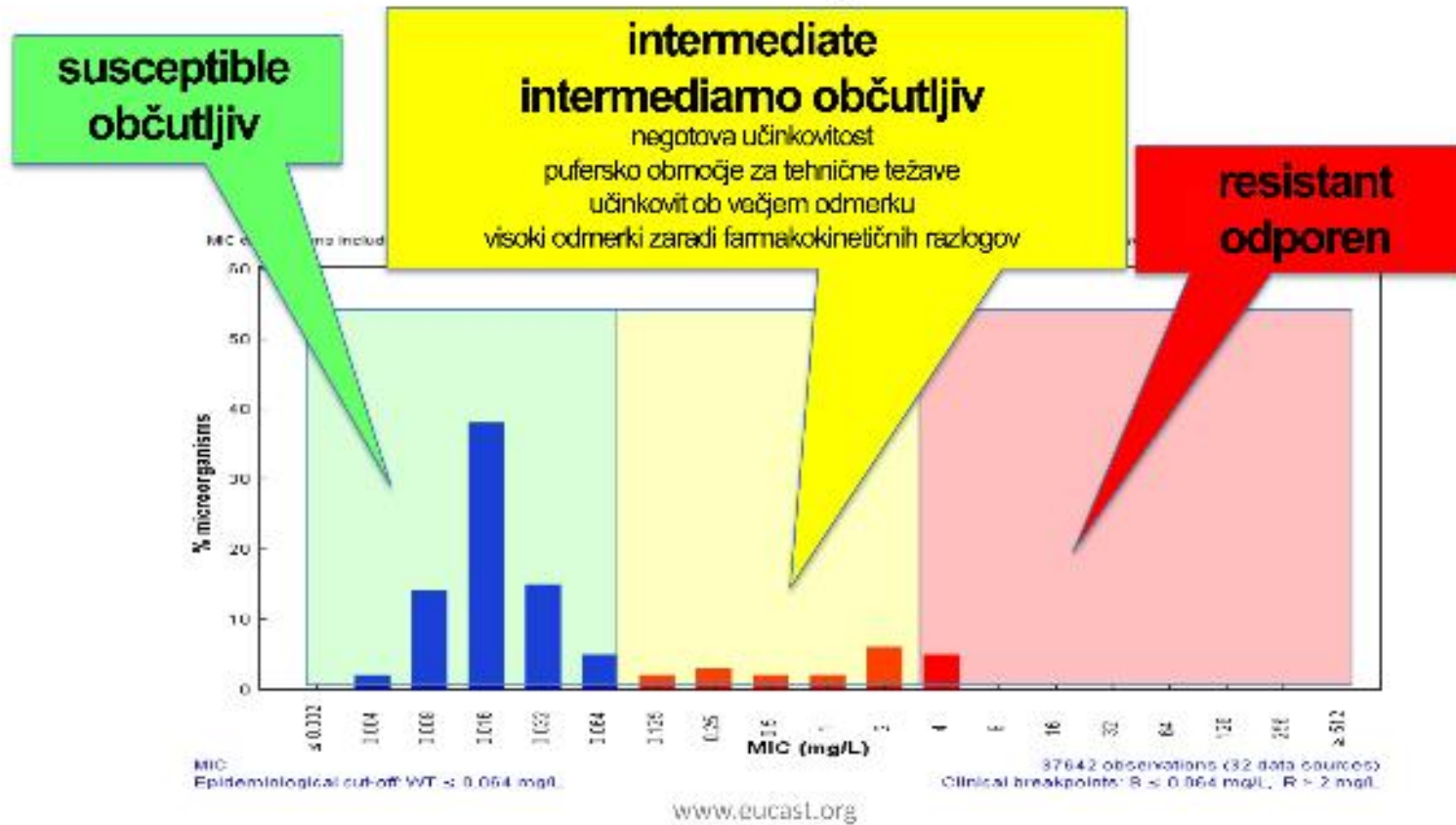
Kako EUCAST določi merila za uvrstitev mikroorganizma/izolata v kategorijo S, I ali R?

- Način odmerjanja (npr. peroralno, iv.)
- Standardni in veliki/maksimalni odmerki zdravila
- Klinične indikacije in tarčni mikroorganizem
- Distribucije MIK posameznih vrst (MIK divjih sevov in MIK sevov z mehanizmi odpornosti)
- Farmakokinetični podatki (PK)
- Farmakodinamični podatki (PD)
- Informacije iz procesov modeliranja, navadno simulacije Monte Carlo
- Klinični podatki, rezultati zdravljenja pri različnih MIK bakterije
- Podatki o mehanizmih odpornosti, o kliničnem pomenu mehanizmov odpornosti, o MIK, ki jih imajo bakterije z različnimi mehanizmi odpornosti



Preiskava na patogene bakterije in glive: določanje občutljivosti za antibiotike

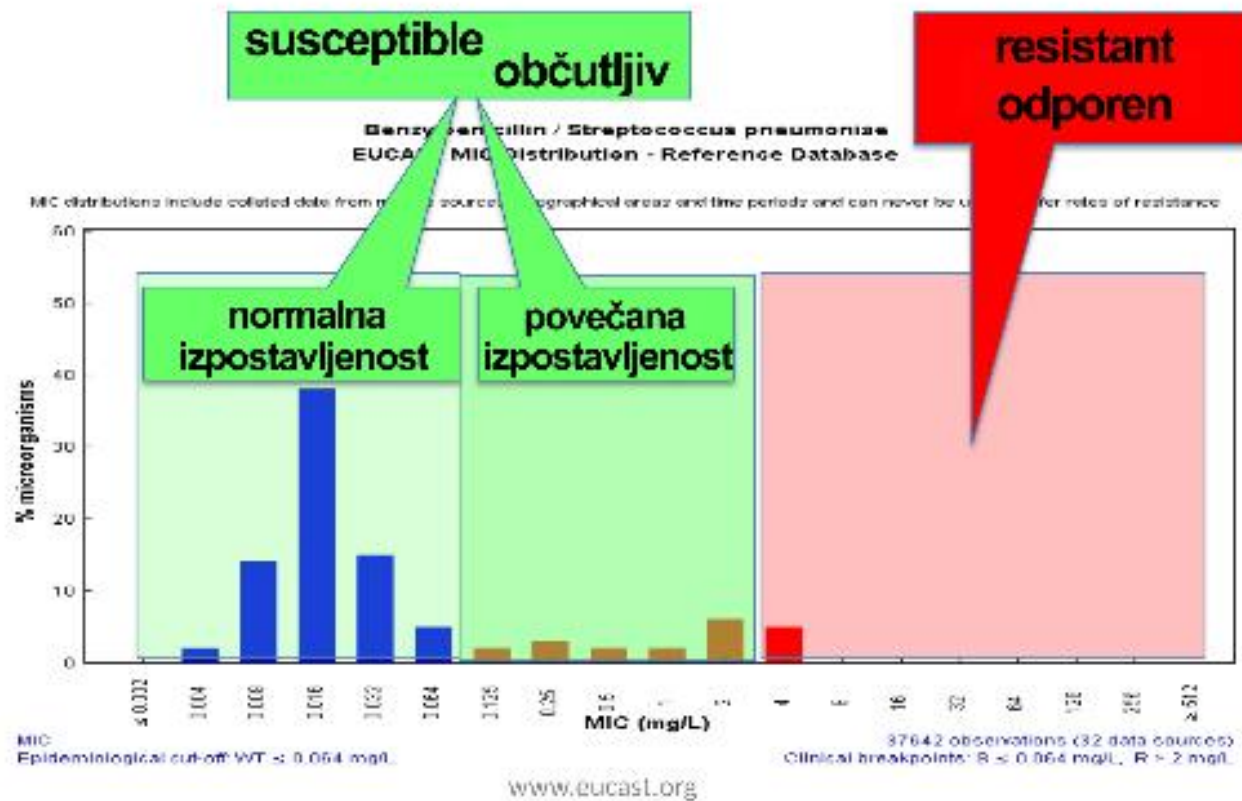
SIR - stare opredelitve





Preiskava na patogene bakterije in glive: določanje občutljivosti za antibiotike

SIR - nove opredelitve

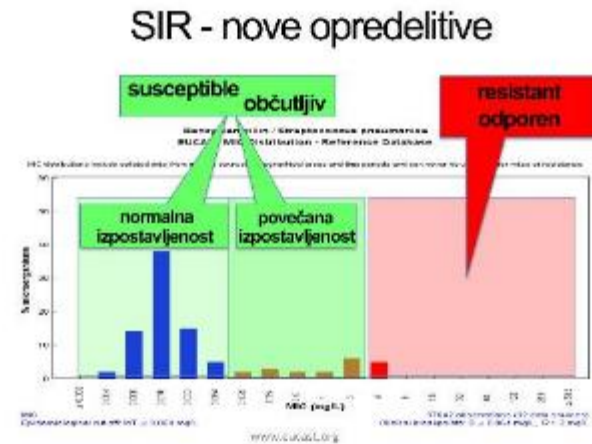




Preiskava na patogene bakterije in glive: določanje občutljivosti za antibiotike

IZPOSTAVLJENOST

- Izpostavljenost **povzročitelja** protimikrobnemu zdravilu na mestu okužbe je odvisna od:
 - Načina aplikacije
 - Odmerka
 - Odmernega intervala
 - Trajanja infuzije
 - Razporeditve protimikrobnega zdravila
 - Presnove protimikrobnega zdravila
 - Izločanja protimikrobnega zdravila
- Izpostavljenost povzročitelja na mestu okužbe povečamo s prilagoditvijo režima odmerjanja, načina aplikacije. Povečana je lahko tudi zaradi naravnega koncentriranja na mestu okužbe



**RAZLIKA MED S IN I JE V KOLIČINI ZDRAVILA, KI JE POTREBNA,
DA DOSEŽEMO USTREZEN KLINIČNI ODZIV**



Preiskava na patogene bakterije in glive: določanje občutljivosti za antibiotike

ODMERKI ANTIBIOTIKA

- standardni/običajni in veliki
- Osnova za določitev kliničnih mejnih vrednosti
- Samo orientacija za odmerjanje v klinični praksi – ne nadomeščajo lokalnih nacionalnih ali regionalnih smernic za odmerjanje antibiotikov
- Odmerek za posameznega bolnika je potrebno prilagoditi lastnostim bolnika, izolatu, vrsti in mestu okužbe in rezultatu antibiograma (če/ko ga imamo)
- <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/dokumenti/OsnoveantibiogramaposmernicahEUCAST1.izdajaapril2019.pdf>
- https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

Preiskava na patogene bakterije in glive: določanje občutljivosti za antibiotike



PODROČJE TEHNIČNE NEGOTOVOSTI (ATU)

Preiskava na ESBL

Rezultat 1. *Escherichia coli* - ESBL

Izolirani sev izloča beta laktamazo razširjenega spektra (ESBL). Interpretacija rezultatov za parenteralne cefalosporine (glej spodaj) in za kombinacije penicilinov z inhibitorji beta laktamaz je skladna z "in vitro" rezultatom. Priporočamo previdnost pri zdravljenju.

| | 1. |
|---------------------------------|----|
| ampicilin | R |
| amoksisilin+klavulanska kislina | R |
| piperacilin+tazobaktam | I* |
| cefuroksim (parenteralni) | R |
| cefotaksim | R |
| ceftriakson | R |
| ceftazidim | R |
| cefepim | R |
| ertapenem | S |
| meropenem | S |
| imipenem | S |
| gentamicin | S |
| amikacin | S |
| ciprofloksacin | R |
| levofloksacin | R |
| trimetoprim+sulfametoksazol | R |

Legenda za tabelo:

(S) - OBČUTLJIV

(R) - ODPOREN

(*) - PODROČJE TEHNIČNE NEGOTOVOSTI - NEZANESLJIV REZULTAT

(I) - OBČUTLJIV, POVEČANA IZPOSTAVLJENOST



Rezultat 1. *Staphylococcus aureus* - MRSA

Izolirani sev je odporen proti vsem betalaktamskim antibiotikom, izjema so novejši cefalosporini, ki učinkujejo proti MRSA, če je izolat zanje občutljiv.

| | 1. |
|-----------------------------|----|
| penicilin | R |
| oksacilin | R |
| cefarolin | S |
| vankomicin | S |
| | 1 |
| teikoplanin | S |
| | 1 |
| gentamicin | S |
| eritromicin | R |
| klindamicin | R |
| tetraciklin | S |
| ciprofloksacin | R |
| trimetoprim+sulfametoksazol | S |
| rifampin | S |
| linezolid | S |
| mupirocin | S |
| fucidinska kislina | S |
| kloramfenikol | S |

„Kritična značilnost“:

- Pojasnilo in opozorilo mehanizma odpornosti: MRSA, ESBL, CRE, CPE...
- Opozorilo na povečano tveganje za razvoj odpornosti

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, odporni proti oksacilinu, so odporni proti vsem betalaktamskim antibiotikom: penicilinom, kombinacijam penicilinov z inhibitorji beta laktamaz, cefalosporinom

(izjema je cefarolin pri *S. aureus*, če je izolat zanj občutljiv) in karbapenemom.

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

tetraciklin: izolat je občutljiv tudi za doksisiklin in minociklin.

ciprofloksacin: uporabljamo le veliki odmerek.

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

mupirocin: rezultat se nanaša na dekolonizacijo nosu.

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

Komentar:

- Prenosljivost rezultata občutljivosti testiranega antibiotika na druge antibiotike
- Omejitve za določene vrste okužb (cistitis, meningitis)
- Omejitve glede na način aplikacije (po/iv)
- Opozorila glede velikosti odmerka



Preiskava na patogene bakterije in glive: osamitev na gojiščih

HEMOKULTURA

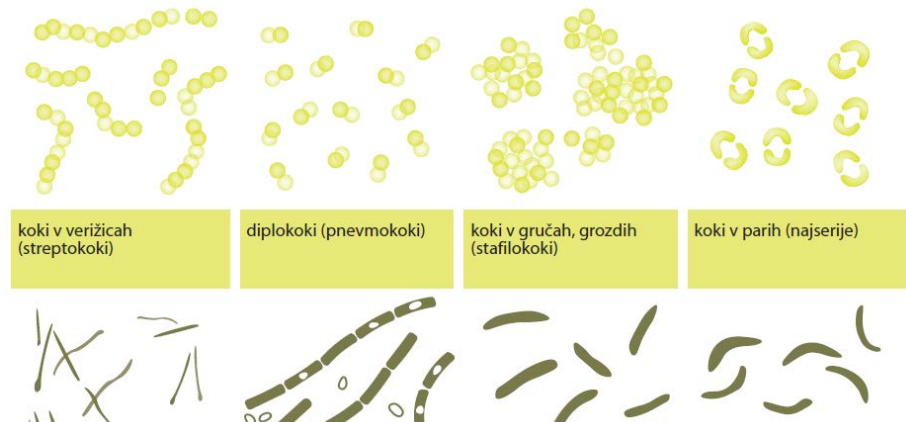
1. Aparat javi pozitivno hemokulturo
2. Gramski razmaz & **DIREKTNA ID**



Enterobakterije

| | N | AM | AMC | TZP | CXMp | CTX | CAZ | FEP | ETP | IPM | CIP | LVX | GEN | AN | SXT |
|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------------|------|------|------|------|------|
| <i>E. coli</i> | 4945 | 49,8 | 78,2 | 94,2 | 90,7 | 92,4 | 92,8 | 92,0 | 100 | 100 | 77,5 | 78,6 | 91,9 | 98,8 | 70,9 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 1113 | / | 82,0 | 86,9 | 85,1 | 89,2 | 88,6 | 88,7 | 99,1 | 99,7 | 79,7 | 82,3 | 93,7 | 98,6 | 81,8 |
| <i>P. mirabilis</i> ^Δ | 888 | 61,7 | 86,3 | 97,7 | 98,0 | 98,1 | 98,0 | 98,4 | 100 | 87,1 ^Δ | 65,0 | 68,0 | 88,6 | 99,6 | 62,0 |
| <i>E. cloacae</i> complex | 703 | / | / | 83,8 | / | 82,8 | 82,9 | 92,6 | 90,7 | 98,6 | 95,3 | 96,0 | 97,3 | 99,3 | 96,2 |
| <i>K. oxytoca</i> | 438 | / | 89,7 | 91,7 | 92,0 | 99,1 | 98,6 | 98,7 | 99,7 | 99,7 | 98,2 | 98,9 | 99,5 | 100 | 96,1 |
| <i>C. freundii</i> | 265 | / | / | 91,4 | / | 86,8 | 87,9 | 97,6 | 99,2 | 100 | 93,2 | 93,6 | 98,5 | 99,2 | 93,6 |
| <i>M. morgani</i> ^Δ | 332 | / | / | 98,8 | / | 91,0 | 91,6 | 99,4 | 99,7 | 87,3 ^Δ | 82,5 | 85,2 | 94,6 | 100 | 84,6 |
| <i>S. marcescens</i> | 243 | / | / | 95,0 | / | 91,8 | 99,2 | 99,2 | 99,6 | 100 | 95,1 | 95,9 | 97,9 | 99,6 | 97,5 |
| <i>E. aerogenes</i> | 179 | / | / | 72,5 | / | 73,2 | 73,7 | 95,8 | 88,6 | 98,8 | 96,6 | 96,1 | 99,4 | 100 | 98,9 |
| <i>C. diversus</i> (<i>koseri</i>) | 189 | / | 93,7 | 97,8 | / | 98,4 | 98,4 | 98,8 | 100 | 100 | 98,9 | 99,5 | 99,5 | 100 | 98,9 |
| <i>P. vulgaris</i> ^Δ | 65 | / | 95,4 | 100 | / | 100 | 100 | 100 | 100 | 73,3 ^Δ | 98,5 | 98,5 | 100 | 100 | 87,7 |
| <i>P. stuartii</i> ^Δ | 82 | / | / | 97,6 | / | 98,8 | 98,8 | 98,8 | 100 | 100 | 62,2 | 62,2 | / | 100 | 89,0 |

N število prvih izolatov, AM ampicilin, AMC amoksiklav, TZP piperacilin tazobaktam, CXMp cefuroksim - parenteralni, CTX cefotaksim, CAZ ceftazidim, FEP cefepim, ETP ertapenem, IPM imipenem, CIP ciprofloksacin, LVX levofloksacin, GEN gentamicin, AN amikacin, SXT trimetoprim sulfametoksazol, / naravna odpornost ali ni testirano, ^Δ bakterije iz rodov *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providentia* spp. (*Proteaceae*) imajo lahko naravno višji MIK za imipenem





Preiskava na patogene bakterije in glive:

Delni izvid

Vzorec **Aspirat traheje** (Odvzeto 11.09.2020 ob 09:40)

Direktni razmaz po Gramu v posameznem vidnem polju je več kot 10 ploščatih epitelnih celic in več kot 25 levkocitov. Mešana bakterijska flora.

URIN

Preiskava na patogene bakterije

- Rezultat**
- 1. *Proteus mirabilis* 1+**
 - 2. *Pseudomonas aeruginosa* 1+**
 - 3. *Escherichia coli* 1+**

Rezultati na **delnem izvidu** niso dokončni in se lahko do konca preiskave bistveno spremenijo. Za dokončne rezultate prosim poglejte **končni izvid**.

L



Enterobakterije

| | N | AM | AMC | TZP | CXMp | CTX | CAZ | FEP | ETP | IPM | CIP | LVX | GEN | AN | SXT |
|----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------------|------|------|------|------|------|
| <i>E. coli</i> | 4945 | 49,8 | 78,2 | 94,2 | 90,7 | 92,4 | 92,8 | 92,0 | 100 | 100 | 77,5 | 78,6 | 91,9 | 98,8 | 70,9 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 1113 | / | 82,0 | 86,9 | 85,1 | 89,2 | 88,6 | 88,7 | 99,1 | 99,7 | 79,7 | 82,3 | 93,7 | 98,6 | 81,8 |
| <i>P. mirabilis</i> ^Δ | 888 | 61,7 | 86,3 | 97,7 | 98,0 | 98,1 | 98,0 | 98,4 | 100 | 87,1 ^Δ | 65,0 | 68,0 | 88,6 | 99,6 | 62,0 |
| <i>E. cloacae</i> complex | 703 | / | / | 83,8 | / | 82,8 | 82,9 | 92,6 | 90,7 | 98,6 | 95,3 | 96,0 | 97,3 | 99,3 | 96,2 |
| <i>K. oxytoca</i> | 438 | / | 89,7 | 91,7 | 92,0 | 99,1 | 98,6 | 98,7 | 99,7 | 99,7 | 98,2 | 98,9 | 99,5 | 100 | 96,1 |
| <i>C. freundii</i> | 265 | / | / | 91,4 | / | 86,8 | 87,9 | 97,6 | 99,2 | 100 | 93,2 | 93,6 | 98,5 | 99,2 | 93,6 |
| <i>M. morgani</i> ^Δ | 332 | / | / | 98,8 | / | 91,0 | 91,6 | 99,4 | 99,7 | 87,3 ^Δ | 82,5 | 85,2 | 94,6 | 100 | 84,6 |
| <i>S. marcescens</i> | 243 | / | / | 95,0 | / | 91,8 | 99,2 | 99,2 | 99,6 | 100 | 95,1 | 95,9 | 97,9 | 99,6 | 97,5 |
| <i>E. aerogenes</i> | 179 | / | / | 72,5 | / | 73,2 | 73,7 | 95,8 | 88,6 | 98,8 | 96,6 | 96,1 | 99,4 | 100 | 98,9 |
| <i>C. diversus</i> (koseri) | 189 | / | 93,7 | 97,8 | / | 98,4 | 98,4 | 98,8 | 100 | 100 | 98,9 | 99,5 | 99,5 | 100 | 98,9 |
| <i>P. vulgaris</i> ^Δ | 65 | / | 95,4 | 100 | / | 100 | 100 | 100 | 100 | 73,3 ^Δ | 98,5 | 98,5 | 100 | 100 | 87,7 |
| <i>P. stuartii</i> ^Δ | 82 | / | / | 97,6 | / | 98,8 | 98,8 | 98,8 | 100 | 100 | 62,2 | 62,2 | / | 100 | 89,0 |

N število prvih izolatov, AM ampicilin, AMC amoksiklav, TZP piperacilin tazobaktam, CXMp cefuroksim - parenteralni, CTX cefotaksim, CAZ ceftazidim, FEP cefepim, ETP ertapenem, IPM imipenem, CIP ciprofloksacin, LVX levofloksacin, GEN gentamicin, AN amikacin, SXT trimetoprim sulfametoksazol, / naravna odpornost ali ni testirano, ^Δ bakterije iz rodov *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providentia* spp. (*Proteeae*) imajo lahko naravno višji MIK za imipenem



Preiskava na patogene bakterije in glive: Določanje občutljivosti za antibiotike

Hitre metode za določanje občutljivosti za antibiotike?

- **Skrajševanje** trajanja testiranja s **klasičnimi metodami** → cca 8h
 - Vsi mehanizmi rezistence se ne bodo zanesljivo izrazili → lahko lažno negativni rezultati
 - Posebno prilagojeni interpretacijski kriteriji
 - spreminjanje antibiotičnega zdravljenja v dežurstvu?



EUCAST RAST

- **RAST = rapid antimicrobial susceptibility test**
- po 4, 6 in 8 urah
- *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *A. baumannii*



EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories

Anna Åkerlund^{1,2,3*}, Emma Jonasson^{4,5}, Erika Matuschek⁵, Lena Serrander^{2,3}, Martin Sundqvist⁶ and Gunnar Kahlmeter^{4,5} on behalf of the RAST Study Group†

Objectives: When bloodstream infections are caused by resistant bacteria, rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) is important for adjustment of therapy. The EUCAST RAST method, directly from positive blood cultures, was validated in a multi-laboratory study in Europe.

Methods: RAST was performed in 40 laboratories in northern Europe (NE) and 15 in southern Europe (SE) from clinical blood cultures positive for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus pneumoniae*. Categorical results at 4, 6 and 8 h of incubation were compared with results for EUCAST standard 16–20 h disc diffusion. The method, preliminary breakpoints and the performance of the laboratories were evaluated.

Results: The total number of isolates was 833/318 in NE/SE. The number of zone diameters that could be read (88%, 96% and 99%) and interpreted (70%, 81% and 85%) increased with incubation time (4, 6 and 8 h). The categorical agreement was acceptable, with total error rates in NE/SE of 2.4%/4.9% at 4 h, 1.1%/3.5% at 6 h and 1.1%/3.3% at 8 h. **False susceptibility at 4, 6 and 8 h of incubation was below 0.3% and 1.1% in NE and SE, respectively,** and the corresponding percentages for false resistance were below 1.9% and 2.8%. After fine-tuning breakpoints, more zones could be interpreted (73%, 89% and 93%), with only marginally affected error rates.

Conclusions: The EUCAST RAST method can be implemented in routine laboratories without major investments. It provides reliable antimicrobial susceptibility testing results for relevant bloodstream infection pathogens after 4–6 h of incubation.

Table 3. Theoretical and actual numbers of tests aggregated for all species, the proportions of tests that could be read and interpreted as S or R (using breakpoint table version 0) after 4, 6 and 8 h and the categorical errors with RAST versus standard DD by EUCAST breakpoint tables version 8.0 at each reading time

| | Incubation time (h) | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 4 | | 6 | | 8 | |
| | NE | SE | NE | SE | NE | SE |
| Theoretical number of tests ^a | 4932 | 2092 | 5199 | 2162 | 5199 | 2162 |
| Number of completed tests ^b | 4571 | 1827 | 5089 | 2121 | 4542 | 2113 |
| Readable zones ^c (% of completed tests) | 4034 (88) | 1590 (87) | 4943 (97) | 1978 (93) | 4477 (99) | 2084 (99) |
| Results calculated on readable zones (%) | | | | | | |
| not interpreted as S or R (ATU) | 21 | 19 | 17 | 15 | 14 | 13 |
| interpreted as S | 74 | 62 | 80 | 68 | 82 | 70 |
| interpreted as R | 4.8 | 19 | 3.8 | 17 | 3.7 | 16 |
| Errors calculated on the total number of zones interpreted as S or R (%) | | | | | | |
| mEs | 0.3 | 1.5 | 0.1 | 1.4 | 0.2 | 1.4 |
| MEs | 1.9 | 2.8 | 0.8 | 1.2 | 0.6 | 0.8 |
| VMEs | 0.1 | 0.5 | 0.2 | 0.9 | 0.3 | 1.1 |
| total errors | 2.4 | 4.9 | 1.1 | 3.5 | 1.1 | 3.3 |



Preiskava na patogene bakterije in glive: Določanje občutljivosti za antibiotike

Hitre metode za določanje občutljivosti za antibiotike?

- **Molekularno določanje občutljivosti za antibiotike**
 - Določamo posamezne znane rezistenčne gene
 - Določimo lahko samo verjetno odpornost!



Sindromska mikrobiološka diagnostika

- Hkratno zaznavanje različnih patogenov z enim molekularnim diagnostičnim testom
- Koristno predvsem pri okužbah, ki jih lahko povzroči več različnih vrst patogenov
 - Sepsa (iz pozitivne hemokulturne stekleničke)
 - Okužbe osrednjega živčevja (likvor)
 - Okužbe dihal (kužnine iz dihal)
 - Infekcijska driska (blato)

FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel

1 Test. 14 Targets. All in about an hour.



Bacteria

Escherichia coli K1
Haemophilus influenzae
Listeria monocytogenes
Neisseria meningitidis
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae



Viruses

Cytomegalovirus (CMV)
Enterovirus
Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
Herpes simplex virus 2 (HSV-2)
Human herpesvirus 6 (HHV-6)
Human parechovirus
Varicella zoster virus (VZV)



Fungi

Cryptococcus neoformans/gattii

ID brez AST!

Ramanan P et. al. Syndromic Panel-Based Testing in Clinical Microbiology. Clin Microbiol Rev 2017;31(1):e00024-17.



- laboratorijske preiskave morajo biti usmerjene na podlagi:
 - anamneze
 - kliničnega pregleda
- Interpretacija rezultatov mikrobioloških preiskav → glede na senzitivnost in specifičnost testov
- **Posvet s kliničnim mikrobiologom** v primeru nejasnosti po potrebi:
 - **Pred** odločitvijo o preiskavi
 - **Ob** odločitvi o preiskavi
 - Pri **interpretaciji** rezultatov

