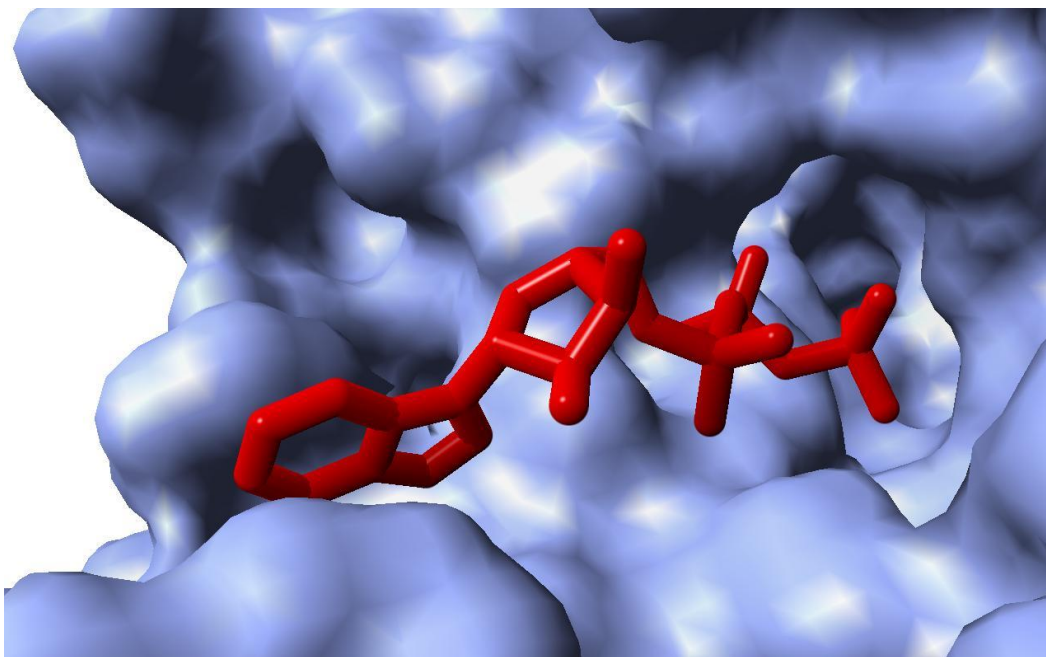




Crna Gora

Ministarstvo zdravlja



LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA U KLINIČKOJ BAKTERIOLOGIJI

Nacionalne smjernice dobre kliničke prakse

Podgorica | 2016.



Crna Gora

Ministarstvo zdravlja

Sekcija ljekara mikrobiologa Društva ljekara Crne Gore

Laboratorijska dijagnostika u kliničkoj bakteriologiji

Nacionalne smjernice dobre kliničke prakse

Podgorica, 2016. godine

Laboratorijska dijagnostika u kliničkoj bakteriologiji

Nacionalne smjernice dobre kliničke prakse

Ministarstvo zdravlja Crne Gore
Sekcija ljekara mikrobiologa Društva ljekara Crne Gore

Autori:

Dr Ljubica Mugoša, Dr Danijela Rajković, Dr Željka Zeković,
Dr Slobodan Nanevski, Dr Gordana Mijović, Dr Milena Lopčić,
Dr Ruža Tomić, Dr Branka Perović, Dr Gordana Zurovac,
Dr Žarko Nikčević, Dr Ljubica Terić, Dr Tatjana Radunović

Recenzenti:

Prof. dr Lazar Ranin
Prof. dr Branislava Savić

Urednik:

Doc.dr Gordana Mijović

Nacionalni komitet za antibiogram (dr Milena Lopčić, dr Gordana Mijović, dr Žarko Nikčević, dr Branka Perović, dr Ruža Tomić, dr Rajna Dapčević, dr Mira Miličić, dr Tatjana Radunović, dr Marijana Mimović, dr Gordana Jelušić, dr Dušan Perović, dr Slobodan Nanevski) je izvršio reviziju poglavlja 31 i 32 i dodao poglavlje 33, 2015. godine.

ISBN 0-000-00000-0

Izdavač: Ministarstvo zdravlja Crne Gore © 2012
Tehnička priprema i dizajn: Aleksandar Klimović
Štampa: XXXXXXXXXXXXXXXX
Tiraž: XXX primjeraka

Predgovor

Ovaj vodič je rezultat potrebe za podizanjem i ujednačavanjem nivoa mikrobiološke dijagnostike na cijeloj teritoriji države Crne Gore. Vodič kojim su definisane standardne operativne procedure rada u obradi kliničkih uzoraka, identifikaciji klinički najznačajnijih bakterija i ispitivanju osjetljivosti bakterija na antibiotike i hemioterapeutike, omogućava da rezultati dobijeni u različitim laboratorijama budu uporedivi i da se njihova validnost ne dovodi u pitanje.

Ministarstvo zdravlja i Sekcija ljekara mikrobiologa Društva ljekara Crne Gore su udružili svoje snage u ostvarivanju jasnog krajnjeg cilja: da mikrobiološki rezultati budu još važniji i sigurniji oslonac kliničarima u postavljanju dijagnoza, a sve za dobrobit pacijenata.

Standardne operativne procedure rada kojima se bavi ovaj dokument se baziraju na naučnim činjenicama i shodno tome podliježe periodičnim revizijama, u skladu sa napretkom nauke.

Namjera je bila da se napravi jednostavan i lako primjenljiv vodič koji će ujedno biti dobra osnova za dalje dopunjavanje, usavršavanje i unapređivanje dobre laboratorijske prakse.

Autori

Institut za mikrobiologiju i imunologiju
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
Dr Subotića 1 МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
11000 Beograd В. О. Ј. ИНСТИТУТ ЗА МИКРОБИОЛОГИЈУ
И ИМУНОЛОГИЈУ

Бр. 111

Beograd, 22.04.2008.

23 APR 2008, 199 год.
Београд

**MINISTARSTVO ZDRAVLJA, RADA I SOCIJALNOG STARANJA
SEKCIJA LJEKARA MIKROBIologa DRUŠTVA LJEKARA CRNE GORE**

Predmet:

Recenzija za " Standardne operativne procedure rada u bakteriološkoj laboratoriji za obradu kliničkih uzoraka, identifikaciju i ispitivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike i hemioterapeutike"

Na osnovu uvida u priloženi tekst smatramo da je priručnik " **Standardne operativne procedure rada u bakteriološkoj laboratoriji za obradu kliničkih uzoraka, identifikaciju i ispitivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike i hemioterapeutike**" napisan jasno u skladu sa opšte prihvaćenim principima za standardne operativne procedure u kliničkoj bakteriologiji. Primena ovog priručnika će doprineti uvođenju jedinstvene laboratorijske metodologije u bakteriološkim laboratorijama Crne Gore. Takođe će ovaj priručnik poslužiti kao odlična osnova za pripremanje standardnih operativnih procedura što će omogućiti da mikrobiološke laboratorije Crne Gore uspešno prikupljaju i dokumentuju relevantne podatke o izazivačima zaraznih bolesti kao i da ostvare saradnju u razmeni tih podataka sa drugim bakteriološkim laboratorijama van zemlje. S obzirom na sadržaj priloženog teksta predlažemo izmenu naziva priručnika u " Vodič za pripremanje standardnih operativnih procedura rada u kliničkoj bakteriološkoj laboratoriji ".

Na osnovu svega izloženog zadovoljstvo nam je da u svojstvu recenzenata predložimo Ministarstvu zdravlja, rada i socijalnog staranja Crne Gore i Sekciji lekara mikrobiologa Društva lekara Crne Gore da prihvate za štampu priručnik poć izmenjenim nazivom " **Vodič za pripremanje standardnih operativnih procedura rada u kliničkoj bakteriološkoj laboratoriji** ".



Lazar Ranin
Prof. dr Lazar Ranin

Branislava Savić
Prof. dr Branislava Savić

Sadržaj

1 Ispitivanje brisa grla	9
2 Ispitivanje brisa nosa	11
3 Ispitivanje brisa nazofarinksa	13
4 Ispitivanje sputuma	14
5 Ispitivanje sadržaja apscesa i dubokih rana	17
6 Ispitivanje brisa kože i površinskih rana	19
7 Ispitivanje tkiva i biopsija.....	23
8 Ispitivanje brisa iz ušnog kanala (bris uva) i sekreta iz srednjeg uva.	31
9 Ispitivanje brisa oka u slučaju <i>conjunctivitis</i> -a i <i>blepharitis</i> -a.....	33
10 Ispitivanje brisa oka u slučaju drugih infekcija oka.....	35
11 Ispitivanje likvora.....	36
12 Ispitivanje krvi (hemokultura).....	39
13 Ispitivanje intravaskularne kanile i sličnih uzoraka	42
14 Ispitivanje fecesa (koprokultura).....	45
15 Koprokultura za izolaciju <i>Vibrio cholerae</i>	47
16 Ispitivanje urina (urinokultura).....	48
17 Ispitivanje vaginalnog brisa.....	54
18 Ispitivanje cervikalnog brisa	57
19 Ispitivanje uretralnog brisa	59
20 Ispitivanje prisustva genitalnih mikoplazmi.....	61

21 Identifikacija Staphylococcus spp.....	62
22 Identifikacija Streptococcus spp. i Enterococcus spp.....	66
23 Identifikacija Neisseria spp. i morfološki sličnih organizama.....	72
24 Identifikacija enterobakterija	75
25 Identifikacija gram negativnih nefermentujućih bacila	79
26 Identifikacija Haemophilus spp. i HACEK grupe organizama ...	81
27 Identifikacija Bordetella spp.	86
28 Identifikacija Campylobacter spp.....	88
29 Identifikacija Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium ulcerans, Corynebacterium pseudotuberculosis.....	89
30 Identifikacija anaerobnih bakterija.....	92
31 Ispitivanje osjetljivosti bakterija na antimikrobne supstance disk difuzionim metodom	94
32 Identifikacija β-laktamaza proširenog spektra	112
33 Identifikacija karbapenemaza produkujućih sojeva	115
DODATAK: Način pripremanja hranljivih podloga koje ne postoje u praškastom obliku kao gotove podloge	116
Literatura	118

1 Ispitivanje brisa grla

1.1 Uzorkovanje

Uzorkovanje obaviti sa pojavom prvih simptoma, prije antibiotičke terapije.

- Pacijenta zamoliti da široko otvori usta i izgovori 'a'. Koristeći dobro osvijetljenje i pritiskajući špatulom korijen jezika, osmotriti unutrašnjost usta tražeći znakove upale, prisustvo bilo kakvih membrana, eksudata ili gnoja.
- Uvesti bris do zadnjeg zida ždrijela. Polako rotirajući u ruci bris, energično prebrisati prostor iza uvule i između tonzilarnih lukova. Prilikom ulaska i izlaska iz ždrijela paziti da se bris ne kontaminira salivom i odložiti ga u sterilan kontejner (epruvetu) ili transportnu podlogu.
- Pacijent ne smije osam časova prije uzimanja brisa koristiti bilo kakav antibiotik, niti ispirati usta bilo kakvim dezinficijensom.

1.2 Transportovanje

Što je prije moguće (najduže za dva časa). Ako je brz transport nemoguć:

- koristiti transportnu podlogu, ili
- na dno epruvete ukapati jednu do dvije kapi sterilnog fiziološkog rastvora, a bris sa materijalom potisnuti do dna da apsorbuje ukapanu tečnost. Na ovaj način transport može biti odložen i za nekoliko sati, jer je spriječeno isušivanje bakterija na šta su one najosjetljivije.
- Ovako pripremljen materijal se čuva na sobnoj temperaturi.

1.3 Zasiјavanje

- krvni agar sa razređenjem

Dodatno kod sumnje na difteriju:

- Claubergova teluritna podloga (alternativa: Leflerov koagulisani serum, Hoyle's telurit agar)

Dodatno kod sumnje na faringealnu gonoreju i meningokokno kliconoštvo:

- VCN čokoladni agar, GC selektivni agar

1.4 Inkubacija

- krvni agar: aerobno, 35-37°C, 16-24h
- Claubergova teluritna podloga (alternativa: Leflerov koagulisani serum, Hoyle's telurit agar): aerobno, 35-37°C, 48-72h (svakodnevno čitanje)
- VCN čokoladni agar, GC selektivni agar: u uslovima sa 5-10% CO₂, 35-37°C, 40-48h (svakodnevno čitanje)

1.5 Tumačenje nalaza

- nalaz *Streptococcus β haemolyticus* gr. A, C i G su uobičajeni patogeni.
- nalaz *Staphylococcus aureus* značajan u ispitivanju kliconoštva (MRSA, metilicin rezistentan *Staphylococcus aureus*, sojevi - intrahospitalna sredina!)

1.6 Izvještavanje

U slučaju da nisu izolovani klinički značajni mikroorganizmi, izvijestiti: *Izolovana fiziološka mikroflora.*

2 Ispitivanje brisa nosa

2.1 Uzorkovanje

Uzima se brisom ispod i iznad donje nosne školjke. Prilikom uzimanja materijala paziti da se ne dotaknu brisom otvor i zidovi atrijuma, pa je najbolje uzeti bris kroz nosni spekulium.

2.2 Transportovanje

Što je prije moguće (najduže za dva časa). Ako je brz transport nemoguć:

- koristiti transportnu podlogu, ili
- na dno epruvete ukapati jednu do dvije kapi sterilnog fiziološkog rastvora, a bris sa materijalom potisnuti do dna da apsorbuje ukapanu tečnost. Na ovaj način transport može biti odložen i za nekoliko sati, jer je spriječeno isušivanje bakterija na šta su one najosjetljivije.
- Ovako pripremljen materijal se čuva na sobnoj temperaturi.

2.3 Zasiјavanje

- krvni agar sa razređenjem i stafilokoknom crtom.

Dodatno, kod sumnje na nazalnu difteriju:

- Claubergova teluritna podloga (alternativa: Leflerov koagulisani serum, Hoyle's telurit agar)

Dodatno, kod sumnje na rinosklerom i ozenu:

endo agar (CLED agar)

2.4 Inkubacija

- krvni agar: aerobno, 35-37°C, 16-24h
- Claubergova teluritna podloga (alternativa: Leflerov koagulisani serum, Hoyle's telurit agar): aerobno, 35-37°C, 48-72h (svakodneвно čitanje)
- Endo agar (CLED agar): aerobno, 35-37°C, 16-24h

2.5 Tumačenje nalaza

- *S.aureus* i *Streptococcus β haemolyticus* gr. A: značaj u eradikaciji kliconoštva (posebno MRSA-intrahospitalna sredina!).
- *H.influenzae*, *S.pneumoniae* i *Moraxella catarrhalis*: izvijestiti uz napomenu da mogu imati značaja u sklopu zapaljenja srednjeg uva, sinusa i donjih respiratornih puteva (ako se nađu u čistoj kulturi ili da dominiraju).
- *Klebsiella rhinoscleromatis* (rhinosclerom), *Klebsiella ozaenae* (ozena).
- *Mycobacterium leprae* (ispituje se po posebnom protokolu).

2.6 Izvještavanje

U slučaju da nisu izolovani klinički značajni mikroorganizmi, izvijestiti:
Izolovana fiziološka mikroflora.

3 Ispitivanje brisa nazofarinksa

3.1 Uzorkovanje

- Uzima se specijalnim žičanim lako savitljivim brisom. Najbolje da bris uzima ljekar specijalista otorinolaringolog ili osoba sa iskustvom.

3.2 Transportovanje

Što je prije moguće (najduže dva časa). Ako je brz transport nemoguć:

- koristiti transportnu podlogu, ili
- na dno epruvete ukapati jednu do dvije kapi sterilnog fiziološkog rastvora, a bris sa materijalom potisnuti do dna da apsorbuje ukapanu tečnost. Na ovaj način transport može biti odložen i za nekoliko sati, jer je spriječeno isušivanje bakterija na šta su one najosjetljivije.
- Ovako pripremljen materijal se čuva na sobnoj temperaturi.

3.3 Zasijavanje

- Bordet-Gengou-ova podloga (priprema se po potrebi); alternativa: CCBA (charcoal cephalixin blood agar) kao selektivnija podloga.

3.4 Inkubacija

- Aerobno, 35-37°C, 2-7 dana (svakodnevno čitanje)

3.5 Tumačenje nalaza

- Ciljani uzročnik: *Bordetella pertussis*

3.6 Izvještavanje

- *Bordetella pertussis* izolovana
- *Bordetella pertussis* nije izolovana

4 Ispitivanje sputuma

4.1 Uzorkovanje

- Daje se prvi jutarnji ispljuvak odmah nakon buđenja, a prije obavljanja lične higijene. Pacijenta savjetovati da ispere usta mlakom vodom (bez dezinficijensa) i da potom nekoliko puta duboko udahne (provokacija kašlja), sačeka nadražaj na kašalj, jako se nakašlje i sadržaj iz dubine pluća ispljune u sterilnu posudu sa širokim otvorom. Rjeđi postupci uzorkovanja: u toku bronhoskopije, bronholavažom, transtrahealno, kod djece nazofaringealni aspirat.
- Dobra praksa - davanje pisanog uputstva pacijentima.
- Dobra praksa: uz sputum dostaviti bris grla na ispitivanje.

4.2 Transportovanje

- Uzorak donijeti u laboratoriju unutar 2 h. (mogućnost transporta-transportni medijumi)
- Ako se sumnja na bronhopneumoniju ili pneumoniju, ne može se odlagati transport i sputum se ne smije držati u frižideru, jer bakterije, koje su najčešći uzročnici ovih oboljenja (*H.influenzae*, *S.pneumoniae*), brzo propadaju na temperaturi nižoj od 35°C.

4.3 Zasijanje

4.3.1 Ispitivanje kvaliteta uzorka

Primarnu obradu uzoraka sputuma treba vršiti u komori za bezbjedan rad klase II.

- Makroskopska evaluacija: opisati sputum (purulentan, mukopurulentan, mukoidan, krvav).
- Direktni mikroskopski preparat:

Birati gnojave dijelove sputuma i napraviti preparat bojen po Gramu, mikroskopirati pod malim uveličanjem.

Kriterijum za trijažu sputuma po *Murray i Washington-u* su prikazani u tabeli br.1.

TABELA 1. Kriterijum za trijažu sputuma po *Murray i Washington-u*

Grupa	Epitelne ćelije po vidnom polju	Leukociti po vidnom polju
1	>25	<10
2	>25	10-25
3	>25	>25
4	10-25	>25
5	<10	>25

Grupe od 1-4 su neprihvatljive za kultivaciju i izvještavaju se: “Uzorak je pretežno saliva, te je neprihvatljiv za kultivaciju. Preporučuje se ponoviti analizu, ako postoji klinička indikacija.”

Ovi kriterijumi nisu odgovarajući za imunokompromitovane, neutropenične, intubirane pacijente, kod sumnje na *Mycobacterium* spp. i *Legionela pneumophila*, ili ako je nemoguće ponoviti uzorkovanje.

Nalaz cilindričnih epitelnih ćelija donjeg respiratornog trakta indikuje da je dobijen kvalitetan uzorak sputuma.

4.3.2 Kultivacija

- krvni agar
- endo agar
- selektivni čokoladni agar za *Haemophilus*

4.4 Inkubacija

- krvni agar: aerobno, 35-37°C, 16-24h
- endo agar: aerobno, 35-37°C, 16-24h
- čokoladni agar: u uslovima sa 5-10% CO₂, 35-37°C, 24-48 h (svakodnevno čitanje)

4.5 Tumačenje nalaza

- Ciljani uzročnici su *H.influenzae*, *S.pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staph.aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* (i rjeđe druge Gram negativne bakterije).
- Kod cistične fibroze i bronhiektazija: *Pseudomonas* spp., *Burkholderia cepacia*, enterobakterije, *Staph.aureus*.
- Rijetki uzročnici: *Nocardia* spp., *Actinomyces* spp. (ispituju se po posebnom protokolu).

4.6 Izvještavanje

U slučaju da nisu izolovani klinički značajni mikroorganizmi, izvjestiti:
Izolovana fiziološka mikroflora usne duplje.

5 Ispitivanje sadržaja apscesa i dubokih rana

5.1 Uzorkovanje

Uzorci koji se mogu ispitivati su:

- sadržaj apscesa dobijen punkcijom ili poslije incizije
- bris rane
- eksudat rane

Optimalno vrijeme uzimanja uzorka - prije sprovedene antimikrobne terapije. Optimalna količina uzorka - minimum 1 ml gnojnog sadržaja, ili dobro natopljen bris.

Optimalno je uzeti 2 brisa: jedan za kultivaciju, drugi za pravljenje direktnog mikroskopskog preparata.

5.2 Transportovanje

Što je prije moguće (najduže do pola sata). Ako je brz transport nemoguć:

- za briseve koristiti transportnu podlogu
- prihvatljivo vrijeme transporta za sadržaj apscesa zavisi od količine uzetog materijala:

Volumen aspiriranog sadržaja:	Optimalno vrijeme za transport do laboratorije:
< 1 ml	< 10 min.
1 ml	< 30 min.
>2 ml	< 3 h

5.3 Zasiјavanje

5.3.1 Direktni mikroskopski preparat

Bris se priprema za direktnu mikroskopiju u vidu tankog razmaza na čistom predmetnom staklu i potom boji po Gramu.

Gnojni sadržaj se sterilnom pipetom ili ezom nanese na čisto predmetno staklo u količini od jedne kapi, razmaže i boji po Gramu.

Izvestiti o prisustvu leukocita i (opisno) mikroorganizama.

5.3.2 Kultivacija

- krvni agar
 - endo agar
 - tioglikolat bujon
 - podloga za anaerobne bakterije sa 5 µg diskom metronidazola
- Dodatno, u slučaju primarnog peritonitisa kod žena i prostatičnog apscesa:
- Čokoladni agar

5.4 Inkubacija

- krvni agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h
- endo agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h
- tioglikolat bujon: aerobno, 16-24 h– presijava se po potrebi, aerobno (krvni agar i/ili endo agar) i/ili anaerobno (podloga za anaerobe)
- podloga za anaerobne bakterije: anaerobno, 35-37°C, 48 h (može i do 5 dana)
- čokoladni agar: u uslovima sa 5-10% CO₂, 35-37°C, 48 h (svakodnevno čitanje)

5.5 Tumačenje nalaza

- Mogući patogeni:
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus β haemolyticus*
 - Druge streptokoke
 - *Enterococcus*
 - Enterobakterije
 - *Pseudomonas spp.*
 - Anaerobi
 - *Actinomycetes*
 - *Nocardia*
 - *N. gonorrhoeae*

U gnoju i eksudatu rane bilo koji izolovani mikroorganizam može biti značajan.

6 Ispitivanje brisa kože i površinskih rana

6.1 Uzorkovanje

- ukoliko je prisutan sekret materijal uzeti suvim pamučnim brisom
- ukoliko nema sekreta bris prethodno natopiti fiziološkim rastvorom
- ukoliko na koži postoje pustule, vezikule ili ulceracije sadržaj iz ovih promjena uzima se sterilnom iglom i brizgalicom.
- sadržaj iz ulkusa može se uzeti irigaciono-aspiracionom metodom pomoću malog šprica bez igle koji se smjesti ispod ivice ulkusa i nježno ispere sa najmanje 1 ml sterilnog fiziološkog rastvora. Poslije masaže ivice ulcusa, ponavlja se irigacija sa još 1 ml sterilnog fiziološkog rastvora. Ivica ulkusa se još jednom izmasira, a onda aspirira 0.25 ml tečnosti i smjesti u sterilan kontejner.

6.2 Transportovanje

Što je prije moguće (najduže za dva časa). Ako je brz transport nemoguć za briseve:

- koristiti transportnu podlogu, ili
- na dno epruvete ukapati jednu do dvije kapi sterilnog fiziološkog rastvora, a bris sa materijalom potisnuti do dna da apsorbuje ukapanu tečnost. Na ovaj način transport može biti odložen i za nekoliko sati, jer je spriječeno isušivanje bakterija na šta su one najosjetljivije.
- Ovako pripremljen materijal se čuva na sobnoj temperaturi.
- Aspirirani sadržaj iz pustula može se transportovati u sterilnim plastičnim kontejnerima.

6.3 Zasijavanje

6.3.1 Direktan mikroskopski preparat

- Radi se, ako je vidljiv gnoj na brisu.

6.4 Kultivacija

Svi brisevi:

- krvni agar
- endo agar

Dodatno, u slučaju da se radi o ujedu životinje ili čovjeka, celulitisu, paronihiji, površnoj povredi:

- podloga za anaerobe sa 5 μ g diskom metronidazola

Dodatno, u slučaju celulitisa kod djece i ljudskog ugriza:

- selektivni čokoladni agar za *Haemophilus*

Dodatno, kod sumnje na difteriju kože:

- cistein telurit krvni agar (alternativa Hoyle's teluritni ag,ar)

Dodatno, kad se traži ispitivanje na gljivične infekcije:

- prema posebnom protokolu

6.5 Inkubacija

- krvni agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h
- endo agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h
- podloga za anaerobe: anaerobno, 35-37°C, 48 h
- čokoladni agar: u uslovima sa 5-10% CO₂, 35-37°C, 48 h (svakodnevno čitanje)
- cistein telurit krvni agar: aerobno, 35-37°C, 48 h (svakodnevno čitanje)

6.6 Tumačenje nalaza

- Mogući patogeni:
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus β haemolyticus* gr. A, B, C i G
 - *Bacteroides spp.*
 - *Clostridium spp.*
 - Anaerobne koke
 - Koagulaza negativni stafilokoki
 - Enterobakterije
 - *Pseudomonas species*
- Najčešći uzročnici infekcija opekotina:
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus β haemolyticus*

- *Pseudomonas spp.*
- *Acinetobacter spp.*
- *Bacillus spp.*
- *Enterobakterije*
- *Koagulaza negativni stafilokok*

- Najčešći uzročnici infekcija ulkusa i dekubitusa:
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptokoke*
 - *Anaerobni Gram »-» bacili*
 - *Clostridium spp.*
 - *Enterobakterije*
 - *Corynebacterium spp.*
 - *Pseudomonas spp.*
 - *Koagulaza negativni stafilokok*

- Najčešći uzročnici paronihije:
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus pyogenes*
 - *Anaerobi*
 - *Haemophilus influenzae*

- Najčešći uzročnici folikulitisa:
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Pseudomonas aeruginosa*

- Najčešći uzročnici celulitisa:
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus β haemolyticus*
 - *Arcanobacterium haemolyticum*
 - *Haemophilus influenzae*
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - *Bacteroides spp.*
 - *Anaerobne koke*

- Uzročnici impetiga:
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus pyogenes*

- Najčešći uzročnici infekcije ujeda:
 - *Streptococcus α haemolyticus*
 - *Pasteurella multocida*

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus β haemolyticus*
- *Anaerobi*
- *Eikenella corrodens*
- *Haemophilus spp.*
- *Koagulaza negativni stafilokoki*
- *Streptobacillus moniliformis*

- Bakterije koje uzrokuju *erysipelas*:
 - *Streptococcus β haemolyticus gr. A i G*
 - *Staphylococcus aureus*

- Bakterija koja uzrokuje *erysipeloid*:
 - *Erysepelothrix rhusiopathiae*

- Bakterije koje uzrokuju *ecthyma gangrenosum*:
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Stenotrophomonas maltophilia*

- Uzročnik *erythrasma-e*:
 - *Corynebacterium minutissimum*

6.7 Izvještavanje

U slučaju da nisu izolovani klinički značajni mikroorganizmi, izvjestiti: *Izolovana fiziološka mikroflora kože.*

Ukoliko su izolovani u čistoj kulturi ili kao dominantna flora mikroorganizmi koji su sastavni dio mikroflore kože, u zavisnosti od uputne dijagnoze, izvjestiti uz komentar: *Izolovani soj porastao u čistoj kulturi ili Izolovani soj porastao kao dominantna flora.*

7 Ispitivanje tkiva i biopsija

7.1 Uzorkovanje

Optimalno vrijeme uzimanja uzorka je prije antimikrobne terapije. Uzorak treba da uzima ljekar ili iskusna osoba. Uzorak treba da bude u dovoljnoj količini da bi mogle da se odrade sve dijagnostičke procedure (količina potrebnog uzorka zavisi od broja zahtijevanih ispitivanja).

- Uzorci tkiva mogu se dobiti na tri načina:
 - kao zatvorena procedura perkutanom biopsijom u toku operacije (uklanjanjem devitalizovanog ili inficiranog tkiva)
 - *post mortem*

Pri uzorkovanju bilo kojim od navedenih načina mogu se javiti problemi.

- Kod perkutane biopsije
 - nedovoljna količina uzorka
 - može se promašiti infektivna lezija
 - kontaminacija florom kože
- Kod uzorkovanja u toku operacije uzorkovanje se ne može ponoviti, stoga treba voditi računa u toku obrade ovih materijala
- Kod uzorkovanja tkiva *post mortem* kontaminacija enteričnom florom, treba oprezno interpretirati rezultate

Mjere bezbjednosti:

- izbjegavati akcidentalne povrede prilikom korišćenja igle
- koristiti sterilne kontejnere u zatvorenim plastičnim kesama
- laboratorijske procedure koje daju infektivni aerosol, sjeckanje i homogenizacija uzoraka moraju se izvoditi u komorama za bezbjedan rad klase II, a ukoliko su u pitanju biohazardi grupe 3 kao što su *M. tuberculosis*, *Brucella species*, ili postoji sumnja na egzotične importovane mikoze, obrada i ispitivanje materijala mora biti izvođena u biološkom kabinetu nivoa 3.
- kad god je moguće koristiti sterilne makaze, preporučljivije u odnosu na skalpel.

Napomena: Kod hroničnih infekcija tkiva potrebno je vršiti ispitivanje i na gljivice, mikobakterije i parazite.

7.2 Transportovanje

- Uzorak transportovati do laboratorije što je prije moguće
- Optimalno vrijeme transporta do laboratorije za tkiva i materijal dobijen biopsijom je do 30 minuta.
- Ukoliko je količina uzorka mala, staviti ga u sterilan fiziološki rastvor da se spriječi sušenje.
- Ukoliko se obrada odlaže uzorak čuvati u frižideru.
- Odlaganje duže od 48h nije poželjno. (Volumen uzorka utiče na prihvatljivo vrijeme transporta. U većim komadima tkiva vijabilnost anaeroba se održava duže vrijeme).

7.3 Zasiјavanje

7.3.1 Direktna mikroskopski preparat

Homogenizovani uzorci:

Staviti kap uzorka na čisto predmetno staklo sa sterilnom pipetom. Razvući sterilnom ezom i napraviti tanak razmaz za bojenje po Gramu.

Nehomogenizovani uzorci:

Preparat se pravi otiskom - sterilnom pincetom uhvatiti dio uzorka i napraviti otisak jednom ili sa više strana uzorka na čisto predmetno staklo, bojiti po Gramu.

Napomena: Za gljivice, Legionella species, Mycobacterium species, H. pylori i parazite postoje posebne tehnike

7.3.2 Kultivacija

Napomena: Uzorak dobijen u formalinu nije prihvatljiv za kulturu.

Primarna obrada uzorka mora biti izvođena u komori za bezbjedan rad klase

II

Usitniti ili homogenizovati uzorak sa odgovarajućim sterilnim priborom (grinder-brus Griffiths tube ili alternativne nelomljive tube) ili sterilnim makazama u sterilnoj petrijevoj šolji na parčice. Kod homogenizacije dodati 0,5ml sterilne filtrirane vode, fiziološkog rastvora, peptona ili bujona da bi pomoglo homogenizaciju.

Inokulisati svaku agar ploču i obogaćeni bujon sa homogenizovanim uzorkom.

Kod nehomogenizovanih uzoraka inokulisati agar ploču sa isjeckanim komadom tkiva.

Za dobijanje pojedinačnih kolonija, raširiti inokulum sa sterilnom ezom.

7.4 Inkubacija

- Hranljive podloge i uslovi inkubacije dati su u tabeli br.2

TABELA 2. Hranljive podloge, uslovi inkubacije i ciljni mikroorganizmi

Za sve uzorke:

Klinička slika/ uslovi	Standardni medijum	Inkubacija			Čitanje kulture	Ciljni organizmi
		Temp.	Atmosfera	Vrijeme		
- <i>Gangrena Myonecrosis</i> - <i>Nekrotizirajuć i fasciitis</i> - Sve druge udružene infekcije	krvni agar	35-37	5-10% CO ₂	40-48h	svakodneвно	bilo koji mikroorganizam
	ENDO agar	35-37	aerobno	16-24h	≥ 16h	
	Podloga za anaerobe sa diskom 5 µg metronidazola	35-37	anaerobno	5 dana	≥ 40h i petog dana	
	bujon za zahtjevne anaerobe koji se presijava nakon 40h na krvni agar i podlogu za anaerobe sa diskom 5µg metronidazola	35-37 35-37	aerobno 5-10% CO ₂ anaerobno	40-48h 5 dana	N/A* svakodneвно ≥ 40h i petog dana	

*N-negativna A-pozitivna

U sledećim situacijama dodati:

Klinička slika/ uslovi	Standardni medijum	Inkubacija			Čitanje kulture	Ciljni organizmi
		Temp.	Atmosfera	Vrijeme		
Ukoliko preparat sugerše na miješanu infekciju	Neomycin fastidius anaerobni agar sa 5 µg diskom metronidazola	35-37	anaerobno	5 dana	≥ 40h i petog dana	Anaerobi

Klinička slika/ uslovi	Standardni medijum	Inkubacija			Čitanje kulture	Ciljni organizmi
		Temp.	Atmosfera	Vrijeme		
<i>Actinomyces</i>	Krvni agar sa dodatkom metronidazola i nalidixinske kiseline	35-37	anaerobno	10 dana	≥ 40h, sedmog i desetog dana	<i>Actinomyces species</i>
Imunokompromitovani, ili suspektne invazivne gljivične infekcije	Sabouraud agar	35-37 i 25-30	aerobno	40-48h*	≥ 40h i nakon osam nedelja	Fungi
<i>Mycetoma Nocardiosis</i>	Lowenstein-Jensen-ov medijum	35-37	aerobno	Nakon 28 dana	Svaka 3-4 dana	Aerobne <i>Actinomycetes</i>
Ukoliko preparat sugerise na miješanu infekciju ili je mjesto uzorkovanja jako „prljavo“	Staph/strep selektivni agar	35-37	aerobno	40-48h*	dnevno	<i>S. aureus</i> <i>Streptococcus</i>

* inkubacija se može produžiti do 5 dana, u tom slučaju ploče treba čitati nakon 40h i produžiti do 5 dana

Napomena: Ukoliko je uzorak nedovoljan za sva ispitivanja, prioritet se daje kliničkim indikacijama nakon konsultacije sa kliničkim mikrobiologom.

Odabrati reprezentativni dio uzorka za određene procedure kao što su kultura na gljivice, *Legionella*, *Mycobacterium species* ili pregled na parazite, u zavisnosti od kliničke slike.

7.5 Tumačenje nalaza

- Bilo koji organizam izolovan iz uzorka tkiva može biti značajan. Najčešći izolati uključuju:
 - *S. aureus*
 - *Streptococci*
 - *Bacteroides species*
 - *Clostridium species*
 - *Mycobacterium species*
 - *Enterobacteriaceae*
 - *Pseudomonas*

- Aerobne aktinomicete
- *Fungi*
- *Actinomyces species*

7.6 Izvještavanje

Opisati direktni mikroskopski preparat bojen po Gram-u: izvještava se nalaz upalnih celularnih elemenata i prisustvo mikroorganizama. Izvjestiti svaki porast uz odgovarajući komentar. U slučaju negativnog rezultata, izvjestiti: *Zasijane podloge ostale su sterilne.*

7.7 Komentar

Vrsta infekcije

Infekcije mekih tkiva

Detekcija uzročnika je teška. Površina lezija je obično kolonizovana polimikrobnom florom neodređene patogenosti. Dezinfekcija površine rane da bi se uklonila ova flora, može dati lažno negativne rezultate ili selektovati organizam kao što je *Pseudomonas aeruginosa*. Da bi se izolovao uzročnik infekcije nekad je potrebno uzorkovanje dubljeg tkiva, naročito u slučajevima infekcije opekotina.

Infekcije mekih tkiva sa nekrozom

Termin se može odnositi na vrstu patogena, vrstu zahvaćenog tkiva, prisustva ili odsustva gasa u tkivu. Primjeri:

- *streptokokna gangrena*
- *udružena gangrena*
- *klostridijalna i neklostridijalna gangrena*
- *Myonecrosis*
- *nekrotizirajući fascitis*

Odgovarajući uzorci su: krv za hemokulturu, tečnost iz bule i biopsija tkiva. Ne treba uzimati bris sa površine lezije, jer će dati miješanu kulturu koja je najčešće kontaminacija.

Nekrotizirajući fasciitis

Infekcija potkožnog masnog tkiva i tkiva između površne i duboke fascije mišića. Brzo se širi, zbog odsustva unutrašnjih barijera. Neki autori smatraju da postoje dva tipa. Tip I nastaje infekcijom najmanje jednom anaerobnom vrstom (*Bacteroides* i *Peptostreptococcus species*) i jednom ili više fakultativnih anaerobnih vrsta (non grupa A streptokoke i članovi *Enterobacteriaceae*).

Obligatni aerobi su rijetko implicirani. Tip II (*haemolyticus streptococcal gangrena*) uzrokovana sa streptokokom grupe A sam ili udružen sa drugim vrstama npr. *S. aureus*.

Udružena gangrena

Javlja se nakon operacija u abdomenu i rezultat je miješane infekcije (*S. aureus*, streptokoke, enterobakterije, *Pseudomonas species* i anaerobne vrste).

Gasna gangrena

Nekroza tkiva, krvavo-serozna sekrecija i prisustvo gasa u tkivu, praćena znacima toksemije. Javlja se nakon trauma ili penetrirajućih povreda tkiva. Uzročnici su *Clostridium species*, naročito *C. perfringens*. Nekat ove bakterije kolonizuju ranu bez izazivanja infekcije, mogu da izazovu celulitis ili mionekrozu.

Infekcije ne-sporogenim anaerobima

Značajni uzročnici infekcija u pelvičnoj i skrotalnoj regiji. Često se javljaju u polimikrobnim infekcijama sa enterobakterijama, streptokokama i vrstama klostridijuma.

Spontana gangrena

Javlja se nakon blagih trauma tkiva ili bez vidljive povrede kod oboljelih od karcinoma kolona, leukemije ili neutropenije. Glavni uzročnici *C. perfringens* i *C. septicum*.

Pyomiositis

Gnojna infekcija skeletnih mišića, češća je u tropskim zemljama. Obično se javlja pojedinačni apsces, ali se dešavaju i multipli apscesi. Oboljeli uglavnom nemaju predisponirajuće faktore, a samo kod 25% se desila povreda. Najčešći uzročnik je *S. aureus*, jako rijetko kod imunokompromitovanih infekciju mogu izazvati gljivice i virusi.

Actinomycosis

Hronična supurativna infekcija, koju karakteriše formiranje apscesa sa produkcijom „sulfurnih granula“. One se uglavnom sastoje od mikro-kolonija *Actinomyces species*. Uobičajena mjesta su u okolini donje vilice, grudni i abdomena. Biopsijom promjena otkriva se uzročnik, najčešće je to *A. israelii*.

Aktinomicetama slični organizmi i *Actinomyces* se obično nalaze u cervikalnim razmazima, ali je klinički značaj sumnjiv.

Traumatska inokulacija

Sa zemljom ili biljkama može da dovede do infekcija sa *Nocardia* species ili nekim gljivama kao npr *Sporothrix schenckii*. *Nocardia* vrste rastu na jednostavnim podlogama na 35-37°C, ali je potrebno duže vrijeme inkubacije - 2-4 nedelje.

Mycetoma

Javlja se u tropskim i subtropskim krajevima, obično nakon punktiformnih rana. Hronični destruktivni proces zahvata kožu, potkožno tkivo, mišiće i kosti. Stvaraju se granulacije u tkivu sa hroničnom inflamacijom i fibrozom. Micetomi mogu da se jave bilo gdje u organizmu.

Na osnovu uzročnika dijele se u dvije kategorije:

1. Eumycetoma: *Acremonium* species, *Leptosphaeria senegalensis*, *Madurella* species, *Scedosporium apiospermum*
2. Actinomycetoma: *Actinomyces* species, *Nocardia* species, *Streptomyces* species.

Mikroorganizmi se nalaze u drenirajućim sinusima tkiva kao agregati filamenata, koji se zovu granule. One se razlikuju od „sulfurnih granula“ kod aktinomikoze, jer nemaju karakteristični čvorast rub. Često su organizmi u ovim sinusima mrtvi ili se javlja kontaminacija drugim bakterijama, pa se bolji rezultati kulture dobijaju biopsijom tkiva.

Duboke ili diseminovane gljivične infekcije

Dijagnoza se može postaviti biopsijom tkiva.

7.7.1 Specifične vrste tkiva koje zahtijevaju dodatna ispitivanja

Srčane valvule - kod sumnje na endokarditis. Rezultati kultivacije treba da su u korelaciji sa rezultatima hemokulture ili serologijom.

Uzorci kosti kod sumnje na osteomijelitis, hemokultura može pomoći dijagnozi.

Biopsija sluznice želuca za ispitivanje na *Helicobacter pylori*.

Biopsije rektalne sluznice za ispitivanje na parazite: *Entamoeba histolytica*, *Shistosoma mansoni* i *S. japonicum*.

Biopsije sluznice tankog crijeva za ispitivanje na prisustvo *Giardia lamblia* i mikrosporidija.

Biopsije kože za ispitivanje na *Micobacterium species* i parazita *Onchocerca volvulus*, *Mansonella streptocerca* i *Leishmania species*.

Biopati plućnog tkiva (perkutano, bronhoskopski, u toku operacija ili post mortem) kod sumnje na *Legionella species*, *Micobacterium species*, gljivice posebno *Aspergillus species*, *Nocardia species* i *Pneumocystis jiroveci*. *Pneumocystis carini* kod imunokompromitovanih. PCP može da se dijagnostikuje manje invazivnim metodama, ali su metode manje osjetljive npr. indukovani sputum ili bronhoalveolarni lavati.

Limfni čvorovi kod limfadenitisa. Sumnja na *Micobacterium tuberculosis*, *Micobacterium avium-intracellulare*, *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia trachomatis*. Dijagnoza se postavlja u kombinaciji sa histološkim i serološkim ispitivanjima.

8 Ispitivanje brisa iz ušnog kanala (bris uva) i sekreta iz srednjeg uva

8.1 Uzorkovanje

- Bris uva uzima se tankim brisom koji se uvlači u ušni kanal kroz sterilan ušni lijevak. Ušna školjka se povlači nagore i unazad kod odraslih, a kod djece dole i naprijed.
- Kod sumnje na *otitis media* bris se uzima jedino ako postoji supuracija t.j. perforacija bubne opne. U protivnom se može uzeti nazofaringealni bris. Timpanocenteza se rijetko koristi.
- Materijal je najbolje uzeti prije uvođenja antibiotske terapije.

8.2 Transportovanje

Što je prije moguće (najduže za dva časa). Ako je brz transport nemoguć:

- koristiti transportnu podlogu, ili
- na dno epruvete ukapati jednu do dvije kapi sterilnog fiziološkog rastvora, a bris sa materijalom potisnuti do dna da apsorbuje ukapanu tečnost. Na ovaj način transport može biti odložen i za nekoliko sati, jer je spriječeno isušivanje bakterija na šta su one najosjetljivije. Ovako pripremljen materijal se čuva na sobnoj temperaturi.

8.3 Zasiјavanje

Preporuka je da se primarna obrada uzoraka vrši u komori za bezbjedan rad klase II.

8.3.1 Direktni preparat bojen po Gram-u za sekret iz srednjeg uva

8.3.2 Kultivacija

- selektivni čokoladni agar za *Haemophilus*
- krvni agar
- endo agar (CLED agar)
- podloga za anaerobe sa neomycinom i 5 µg diskom metronidazola

8.4 Inkubacija

- čokoladni agar: u uslovima sa 5-10% CO₂, 35-37°C, 40-48 h, (svakodnevno čitanje)
- krvni agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h
- endo agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h
- podloga za anaerobe: anaerobno, 35 – 37° C, 40 – 48 h (do5 dana).

8.5 Tumačenje nalaza

- Mogući patogeni:
 - *Streptococcus β haemolyticus* gr. A, C, G
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - *Moraxella catarrhalis*
 - *Pseudomonas spp.*
 - *Haemophilus influenzae*
 - Enterobakterije
 - Anaerobne bakterije (gram “-“)
 - *Candida spp.*
 - *Aspergillus spp.*
- Vrlo rijetki uzročnici:
 - *Aloicoccus otitidis*
 - Korineformne vrste
 - *Scedosporium apiospermum.*
- Mogući kontaminanti iz spoljašnjeg ušnog kanala:
 - Alfa hemolitične streptokoke
 - *Bacillus spp.*
 - Koagulaza negativni stafilokok
 - Enterobakterije

8.6 Izvještavanje

U slučaju da nisu izolovani klinički značajni mikroorganizmi, izvijestiti:
Izolovana fiziološka mikroflora spoljnog ušnog kanala.

9 Ispitivanje brisa oka u slučaju *conjunctivitis*-a i *blepharitis*-a

9.1 Uzorkovanje

- odstraniti suvišan sekret sterilnom gazom
- preostali sekret uzeti sterilnim brisom
- ukoliko nema sekreta bris se uzima sa unutrašnje strane donjeg kapka
- kod sumnje na hlamidijalnu ili virusnu infekciju oka, materijal se uzima skrepingom konjunktive (oftalmolog!!!)
- materijal sa rožnjače uzima ljekar oftalmolog u specijalističkoj ambulanti
- posebno uzeti materijal iz desnog i lijevog oka

9.2 Transportovanje

Što je prije moguće (najduže za dva časa). Ako je brz transport nemoguć:

- koristiti transportnu podlogu, ili
- na dno epruvete ukapati jednu do dvije kapi sterilnog fiziološkog rastvora, a bris sa materijalom potisnuti do dna da apsorbuje ukapanu tečnost. Na ovaj način transport može biti odložen i za nekoliko sati, jer je spriječeno isušivanje bakterija na šta su one najosjetljivije. Ovakvo pripremljen materijal se čuva na sobnoj temperaturi.

9.3 Zasiјavanje

9.3.1 Direktna mikroskopski preparat

- u slučaju ozbiljnih infekcija oka, kod neonatusa sa “ljepljivim” očima i od kanalikularnog gnoja
- na čistim neupotrebljanim staklima
- bojiti po Gram-u
- preparat se ne pravi kod *blepharitis*-a i *conjunctivitis*-a

9.3.2 Kultivacija

- krvni agar (sa stafilokoknom crtom na razrijeđenom dijelu)
- selektivni čokoladni agar za *Haemophilus*

- endo agar

Dodatno:

- ako je u pitanju novorođenče i na podlogu za izolaciju *N. gonorrhoeae* (VCN čokoladni agar)

9.4 Inkubacija

- krvni agar: u uslovima sa 5-10% CO₂, 35- 37° C, 40-48 h (svakodnevno čitanje)
- selektivni čokoladni agar: u uslovima sa 5-10% CO₂, 35-37° C, 40-48 h (svakodnevno čitanje)
- endo agar- aerobno, 35- 37°C, 16- 24 h

Dodatno:

- VCN čokoladni agar: u uslovima sa 5-10% CO₂, 35-37° C, 40-48 h (svakodnevno čitanje)

9.5 Tumačenje nalaza

- U slučaju *conjunctivitis*-a i *blepharitis*-a patogenima se smatraju:
 - *H.influenzae*
 - β hemolitični streptokok gr. A, B, C i G
 - *Moraxella spp.*
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *N. gonorrhoeae*
 - *N. meningitidis*
 - *Clamidia trachomatis* (obrađeno u protokolu za virusološke i serološke procedure)
 - Drugi mikroorganizmi

9.6 Izvještavanje

U slučaju da nisu izolovani klinički značajni mikroorganizmi, izvijestiti: *Izolovana fiziološka mikroflora.*

10 Ispitivanje brisa oka u slučaju drugih infekcija oka

- *Canaliculitis*
- *Celulitis orbitae*
- *Dacriocystitis*
- *Dacrioadenitis*
- *Keratitis*
- *Endophtalmitis*
- *Hypopyon*
- Infekcije poslije operacije ili traume

10.1 Uzorkovanje

- Bris oka - uzorak ograničene vrijednosti
- Pravi uzorak - aspirat iz tkiva zahvaćenog infekcijom

10.2 Transportovanje

Što prije poslati do laboratorije (anaerobi!) Ako je brz transport nemoguć:

- koristiti transportnu podlogu

10.3 Zasiјavanje

- krvni agar sa stafilokoknom crtom
- endo agar
- selektivni čokoladni agar za *Haemophilus*
- podloga za anaerobne bakterije sa 5µg diskom metronidazola

10.4 Inkubacija

- krvni agar i čokoladni agar: u uslovima sa 5-10% CO₂, 35-37°C, 40-48 h (svakodnevno čitanje)
- endo agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h
- podloga za anaerobne bakterije: anaerobno, 35-37°C, 40-48 h (do 5 dana)

10.5 Tumačenje nalaza

- U slučaju dubokih infekcija oka, u brisu oka ili aspiratu, patogenim se smatraju sve nađene bakterije.

11 Ispitivanje likvora

11.1 Uzorkovanje

- Uzorak likvora se uzima pod najstrožijim uslovima asepsie lumbalnom punkcijom između 3. i 4. lumbalnog pršljena.
- Koža se prvo dezinfikuje alkoholom, a potom jodom i ostavi da se osuši i ponovo obriše alkoholom.
- Stručno lice koje obavlja punkciju mora imati na rukama sterilne hirurške rukavice.
- Za bakteriološki pregled likvor se skuplja u sterilnu epruvetu u količini 1-2 ml (za novorođenčad može i bilo koji manji volumen).
- Najbolje je zasijati likvor odmah kraj bolesničkog kreveta.

11.2 Transportovanje

- ako je neophodan transport, on ne smije biti duži od 2 sata, pri tome se epruveta sa likvorom drži stisnuta u ruci, a po potrebi se ruka sa epruvetom stavlja pod pazuh da bi se obezbjedila potrebna temperatura za preživljavanje bakterija; preporučuje se transportni termostat
- ukoliko likvor mora da sačeka transport čuva se u termostatu na 35-37° C (nikako u frižideru)

11.3 Zasijavanje

11.3.1 Direktan mikroskopski preparat

- upotrebiti nova, nekorišćena stakla, koja se drže u alkoholu, a prije upotrebe isperu destilovanom vodom, osuše i provuku kroz plamen.
- praviti dva preparata: jedan se boji po Gramu, a drugi metilenom

- za pravljenje preparata koristiti sediment sa dna epruvete nakon centrifugiranja (ne razvlačiti kap naneseu na staklo)
- nakon sušenja na vazduhu, preparate fiksirati prelivanjem 95-100% metil alkoholom koji se ostavi na preparatu 1 minut, odlije, a preparat se ponovo suši na vazduhu. Alternativa je brzo provlačenje preparata 3 puta kroz plamen (nakon toga kada se dodirne rukom poledina stakla treba da je blago zagrijana - ne vruća)
- Kod sumnje na *Cryptococcus neoformans*, uzeti jednu kap likvora sa dna epruvete i dodati jednu kap 50% indijskog tuša i pokriti pokrovnim staklom.

Likvor centrifugirati 5 minuta na 3000 obrtaja/min. Supernatant odliti sterilnom Pasterovom pipetom u drugu sterilnu epruvetu, a sediment lagano izmješati na vorteks aparatu ili vrteći epruvetu u ruci i koristiti za pravljenje preparata i zasijavanje (po jedna kap sedimenta na dva predmetna stakla za preparat i po jedna kap za zasijavanje podloga).

11.3.2 Kultivacija

- moždanosrčani infuzioni krvni agar sa stafilokoknom crtom
- obogaćeni čokoladni agar
- tečni Muller-Hinton sa X i V faktorima rasta ili moždano-srčani infuzioni bujon sa X i V faktorima rasta - presijava se nakon inkubacije na moždano-srčani infuzioni krvni agar sa stafilokoknom crtom i obogaćeni čokoladni agar

Prije zasijavanja likvor i podloge se drže u termostatu na 37° C pola sata.

Zasijavanje se obavlja tako što se sterilnom pipetom ili ezom sa dna epruvete uzme po jedna kap taloga i nanese na svaku od podloga. Podloge staviti u termostat da se kap osuši, a potom razvući materijal ezom po podlozi.

11.4 Inkubacija

- sve zasijane podloge: u uslovima sa 5-10% CO₂, 35-37° C, 40-48h (svakodnevno čitanje)

11.5 Tumačenje nalaza

- patogenim se smatraju sve nađene bakterije

Za detekciju solubilnih antigena u likvoru bakterija koje su najčešći uzročnici meningitisa (*N.meningitidis* A, B, C, *Streptococcus pneumoniae* i *H.*

influenzae) radi se komercijalni lateks aglutinacioni test. Test se izvodi prema uputstvu proizvođača, a koristi se u sljedećim slučajevima:

- kod pacijenata sa imunodeficijencijom kod kojih leukociti mogu nedostajati u likvoru, uprkos postojanju infekcije
- pacijenti tretirani antibioticima prije nego je uzet likvor na ispitivanje

U izvještaju sa negativnim rezultatom staviti napomenu: Postoji mogućnost lažno negativnog rezultata.

11.6 Izvještavanje

U slučaju negativnog rezultata, izvjestiti: *Zasijane podloge ostale su sterilne*

12 Ispitivanje krvi (hemokultura)

12.1 Uzorkovanje

- krv se uzima iz kubitalne vene pod uslovima najstrože asepsse (kod odojčadi i male djece iz temporalne vene)
- prije venepunkcije kožu dezinfikovati alkoholom, pa jodom koji se ostavi da se osuši, pa ponovo obriše alkoholom
- venepunkciju obavezno obavljati koristeći sterilne rukavice
- uzima se 10-30 ml za odrasle, 1-5 ml za djecu (prema tjelesnoj masi)

Idealno je uzimanje uzorka krvi 30 minuta pred očekivani skok temperature što često nije moguće primijeniti zbog nepredvidljivih skokova temperature.

Zavisno od različitih uslova i situacija treba se pridržavati sljedećih preporuka:

- u akutnim febrilnim bolestima kao što su meningitis ili bakterijska pneumonija, gdje može biti neophodno odmah uključiti empirijsku antibiotsku terapiju, ili ako se radi o pacijentima sa infekcijama kao što su osteomijelitis ili supurativni artritis koji su bili podvrgnuti hitnoj hirurškoj intervenciji, uzimaju se dva odvojena uzorka iz dvije ruke, istovremeno, tj. neposredno jedan za drugim.
- ako je nepoznat uzrok febricitiranja, uzimaju se dva uzorka krvi u razmaku od 45 do 60 minuta. Na ovaj način se može pokušati razlučiti da li postoji kontinuirano ili povremeno rasijavanje mikroorganizama u krvotok. Nova dva uzorka krvi na isti način mogu biti uzeta nakon 24 do 48 h poslije prvog uzorkovanja, ukoliko se za tim ukaže potreba.
- u slučajevima akutnog infektivnog endokarditisa, uzimaju se tri uzorka iz tri odvojene venepunkcije u prvih 1 do 2 sata od postavljanja dijagnoze, a potom se započinje terapija. Kod sumnje na subakutni bakterijski endokarditis prvog dana se uzimaju tri odvojena uzorka krvi sa razmakom od najmanje 30 minuta. Ukoliko se dobije negativan nalaz, uzimaju se dva nova uzorka narednih dana. Kada su rezultati hemokultura negativni, uprkos postojanju jasnih kliničkih znakova i simptoma bolesti, kliničar treba da mikrobiologu na to skrene pažnju, kako bi se u ispitivanju naredne hemokulture primjenile obogaćene podloge.

Uobičajena je praksa da se pri svakoj venepunkciji uzme krvi dovoljno za dvije hemokulture: jednu koja će se inkubirati aerobno i drugu koja će se inkubirati anaerobno. Preporuka je za **odrasle** da minimalni volumen po jednoj hemokulturi bude **10 ml** krvi.

12.2 Transportovanje

- krv zasijati uz postelju bolesnika, a ako je to nemoguće, dodati u epruvetu sa krvlju sterilan antikoagulans odmah po uzimanju i transportovati bez odlaganja
- zasijane podloge držati u termostatu do transporta (nikako u frižideru)

12.3 Zasijavanje

Krv za hemokulture se dodaje podlozi u razmjeri 1:5 ili 1:10 kako bi se razblažili postojeći antibiotici i druge antibakterijske supstance u uzorku.

Koristiti komercijalne gotove podloge za hemokulture. Moguće je korišćenje i podloge za automatizovane sisteme za ispitivanje hemokultura uz odgovarajuću aparaturu i prema uputstvu proizvođača.

12.4 Supkultivacija

Pozitivnost hemokulture registrovati prema uputstvu proizvođača gotove komercijalne podloge.

Pozitivnu hemokulturu presijati na:

- Krvni agar sa stafilokoknom crtom
- Podloga za anaerobe sa diskom 5 µg metronidazola (na ovu podlogu presijava se pozitivna bočica za anaerobnu hemokulturu)

12.5 Inkubacija

- Krvni agar sa stafilokoknom crtom: u uslovima sa 5-10% CO₂, 35-37°C, 40-48h (svakodnevno čitanje)
- Podloga za anaerobe: anaerobno, 35-37°C, 40-48 h (do 5 dana)

12.6 Tumačenje nalaza

- Izvještava se bilo koji izolovani organizam uz komentar o kliničkom značaju kada postoji sumnja
- Sumnja u klinički značaj izolata postoji kada su izolovani različiti mikroorganizmi u parnom uzorku hemokulture, ili ako je jedan uzorak iz para sterilan – u takvim slučajevima se u napomeni sugerije kliničarima da ponove analizu

- Kad se iz jedne hemokulture izoluju 2 ili više bakterijskih vrsta koje su mikroflora kože, preporučuje se ponavljanje analize uz naznaku da je hemokultura kontaminirana

12.7 Izvještavanje

U slučaju negativnog rezultata, izvijestiti: Zasijane podloge ostale su sterilne nakon ... dana inkubacije.

13 Ispitivanje intravaskularne kanile i sličnih uzoraka

13.1 Uzorkovanje

- vrh kanile: dezinfikovati kožu oko mjesta insercije kanile, odstraniti kanilu na aseptičan način, i odsjeći sterilnim makazama vrh kanile dužine 4 cm u sterilnu posudu (ovaj uzorak daje validne informacije, ali zahtijeva uklanjanje kanile što može ponekad dovesti do gubljenja prilaza veni)
- brisevi-mogu se koristiti brisevi sa mjesta insercije kao alternativni uzorci, ali rutinsko ispitivanje kod asimptomatskih pacijenata može imati sumnjivu vrijednost. Korisno je jedino kad postoji klinički dokazana lokalna infekcija. Bris kože oko CVK ili čvora (HUB) kanile može se koristiti za prognoziranje infekcije na mjestu insercije kanile.

13.2 Transportovanje

Što je prije moguće (najduže za dva časa). Ako je brz transport nemoguć za briseve:

- koristiti transportnu podlogu, ili
- na dno epruvete ukapati jednu do dvije kapi sterilnog fiziološkog rastvora, a bris sa materijalom potisnuti do dna da apsorbuje ukapanu tečnost. Na ovaj način transport može biti odložen i za nekoliko sati, jer je spriječeno isušivanje bakterija na šta su one najosjetljivije. Ovako pripremljen materijal se čuva na sobnoj temperaturi.

13.3 Zasijavanje

Tehnike koje se koriste za dijagnozu lokalne ili sistemske infekcije povezane sa kanilom uključuju:

- semikvantitativnu i kvantitativnu kultivaciju segmenata kanile
- bujon kultivacija segmenata kanile, posebno vrha
- bojenje kanile
- kultura krvi aspirirana kroz i.v. kanilu
- kultura čvora (eng. hub) kanile

- kultura mjesta insercije kanile
- ultrasonikacija kanile

13.3.1 Semikvantitativna metoda

- Krvni agar

Kultura spoljne površine kanile primjenjuje se za predviđanje koji kateteri su zaista inficirani i mogu da uzrokuju infekciju krvi. Krajnih 4 cm segmenta kanile (uzetih pod strogo aseptičnim uslovima) kotrlja se preko čitave površine agar ploče 5 puta i broje se izrasle kolonije. “Cut off” preko 15 kolonija bilo kog organizma je najčešće prihvatljiv za prognoziranje pojave sepse uzrokovane kaniom. *(Međutim, u praksi ovaj cut off može biti suviše nizak ako se ne primjenjuju stroge mjere opreza pri uklanjanju kanile, gdje cut off veći od 100 kolonija može biti više odgovarajući).*

13.3.2 Kvantitativna metoda

Ova metoda daje informacije i o unutrašnjoj i o spoljašnjoj površini kanile. Cut off od 1000 cfu/ml se koristi kao indikator sepse.

Ova metoda je veoma zahtjevna i ne preporučuje se njena rutinska primjena u ovom SOP-u. Ove metode su podjednako efikasne u predviđanju odsustva infekcije.

13.3.3 Obogaćena metoda

Krajnji segment kanile se stavlja u obogaćeni bujon. Ova metoda ne razlikuje kolonizaciju, infekciju ili kontaminaciju kanile i ne preporučuje se u ovom protokolu.

13.3.4 Metoda “endoluminal brush”

Smatra se preciznom metodom za detektovanje sepse povezane sa kateterom bez potrebe uklanjanja katetera.

13.3.5 Brza dijagnostička metoda

Bojenje kanile (ili uzimanje otiska kanile) po Gramu ili sa *Acridine orange*.

13.4 Inkubacija

- krvni agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h

13.5 Tumačenje nalaza (za semikvantitativnu metodu)

- Mikroorganizmi koji se najčešće izoluju:
 - Koagulaza negativni stafilokoki
 - *Staphylococcus aureus* uključujući MRSA
 - *Enterobacteriaceae*
 - *Pseudomonas*
 - *Enterococcus*
 - *Corynebacterium species*
 - *Streptococcus*
 - *Bacillus species*
 - Mogu se izolovati i gljivice: *Candida albicans* i dr. kvasnice, *Aspergillus species*, *Fusarium species*.

13.6 Izvještavanje

13.6.1 Kanila

- Izvjestiti broj CFU izolovanog mikroorganizma uz napomenu: npr. porast ≥ 15 CFU može biti povezan sa sistemskom infekcijom u vezi sa kanilom ili može biti površinska kolonizacija ili kontaminacija - treba uzeti u obzir rezultat hemokulture.

13.6.2 Brisevi

- Izvjestiti kakav je intenzitet porasta (masovan, umjeren ili oskudan) uz napomenu koja će uzeti u obzir da li postoji ili ne lokalna infekcija.

14 Ispitivanje fecesa (koprokultura)

14.1 Uzorkovanje

- Feces se uzima neposredno poslije defekacije. Pacijenta savjetovati da defekaciju obavi u noćnu posudu, opranu deterdžentom i dobro ispranu (ne mora biti sterilna). Iz noćne posude prebaciti u kontejner sa poklopcem, 1-2 g fecesa (veličina lješnika), pri čemu treba birati **sluzave, gnojave i krvave djelove**, ako ih ima.
- Kod odojčadi feces se uzima sa pelene na isti način kao kod odraslih.
- Rektalni bris treba uzimati samo u izuzetnim slučajevima, tj. kada je nemoguće dobiti feces.
- Dobra praksa – davanje pisanog uputstva pacijentima.

14.2 Transportovanje

- Transport do laboratorije treba obaviti u roku od 2 sata, a u protivnom uzorak se konzerviraše pufersanim glicerolom (pomiješati jednake dijelove 0,033 M natrijum ili kalijum fosfatnog pufera i glicerola).

U slučaju negativnog nalaza analizu treba ponoviti još 2 puta, da bi se mogao isključiti eventualni patogen.

14.3 Zasiјavanje

- 2 SS agara (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*)
- selenit F bujon (*Salmonella*, *Shigella*)
- sorbitol agar (EPEC O:157 H:7)
- selektivna podloga za kampilobakter

14.4 Inkubacija

- SS agar: aerobno, 35 - 37° C, 16-24 h
- SS agar: aerobno, sobna temperatura, 16-24 h
- Selenit F bujon: aerobno, 35 - 37°C, 8-12 h, a potom presijati na SS agar koji se inkubira aerobno, 35 - 37°C, 16-24 h
- sorbitol agar: aerobno, 35 - 37°C, 16-24 h
- selektivna podloga za kampilobakter: mikroaerofilni uslovi, 42-43°C, 40-48 h.

14.5 Tumačenje nalaza

- Mogući patogeni:
 - *Salmonella* spp.
 - *Campylobacter* spp.
 - *Shigella* spp.
 - *Yersinia enterocolitica*
 - *Escherichia coli* O:157; H:7
 - *Clostridium difficile* (ispituje se po posebnom protokolu)
 - *Vibrio cholerae* (vidi protokol 13.1)

14.6 Izvještavanje

U slučaju da nisu izolovani klinički značajni mikroorganizmi, izvjestiti: Kulturom nisu izolovane *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O:157; H:7, *Yersinia enterocolitica*.

15 Koprokultura za izolaciju *Vibrio cholerae*

Ne radi se u rutinskoj dijagnostici već prema epidemiološkim indikacijama!

15.1 Zasijavanje

- alkalna peptonska voda (APV)
- TCBS

15.2 Inkubacija

- APV: aerobno, 35-37°C, 8 h, nakon čega presijati APV na TCBS
- TCBS: aerobno, 35-37°C, 16-24 h

15.3 Izvještavanje

- *Vibrio cholerae* nije nađen.
- *Vibrio cholerae* je nađen.

16 Ispitivanje urina (urinokultura)

16.1 Uzorkovanje

Optimalno vrijeme je prije primjene antimikrobne terapije.

16.1.1 Metodi uzimanja:

- **srednji mlaz urina** (MSU) preporučeni metod za rutinsku praksu. Nakon pranja anogenitalne regije sa dosta vode (bez upotrebe dezinficijensa), prvi dio čistog urina se odbaci i bez prekidanja mlaza, oko 10 ml se sakupi u sterilnu posudu. Ako se koristi borna kisjelina posuda se puni do oznake i sadržaj dobro promućka
- **clean - catch urin** (CCU) dobra alternativa MSU. Preporučuje se potpuno pranje periuretralnog predjela. Cijeli uzorak se sakuplja u sterilnu posudu i šalje na ispitivanje
- **suprapubični aspirat** (SPA) urin se uzima aseptično, direktno iz bešike, aspiriranjem iglom i špricom
- **urin iz katetera** (CSU) može se dobiti jednom kateterizacijom / “in and out”, ili iz stalnog katetera
- **urin iz kese** – sterilna kesa se pričvrsti preko svježe opranih i osušenih genitalija, a sakupljeni urin se prenosi u sterilnu posudu sa poklopcem
- **filter papir** – poslije detaljnog pranja genitalija i okolne kože, filter papir se stavlja u pelenu. Čim se ovlaži, vrhom šprica se izvuče urin i prebaci u sterilnu posudu
- **urin iz urostome** – dobija se preko sterilnog katetera koji aseptično ulazi kroz urostomu
- **urin uzet cistoskopijom**
- **urin iz uretera** – uzet u toku cistoskopije pomoću ureternog katetera
- **uzorci za dijagnozu prostatitisa** – su sljedeći:
 - prvih 5 - 8 ml urina (uretralni urin)
 - srednji mlaz urina (iz bešike)
 - sekret prostate poslije masaže prostate
 - prvih 2 - 3ml urina poslije masaže prostate
- **urin za *S. typhi* i *S. paratyphi*** - uzima se bilo koji urin suspektnih slučajeva ili kontakta
- **rani jutarnji urin** (EMU) - tri cijela, prvoizlučena prva jutarnja urina su potrebna za kultivisanje *M. Tuberculosis*

16.2 Količina uzorka

- najmanje 1 ml uzorka u sterilnu posudu sa poklopcem
- napuniti do linije označene na posudi sa bornom kisjelinom

16.3 Transportovanje

Vrijeme između uzimanja i obrade uzorka:

- do 4 h - ako je moguće
- do 48 h - propadanje uzorka se izbjegava hlađenjem
- do 96 h - uzorak se uzima u sterilan, zatvoren kontejner sa 1-2% bornom kisjelinom

16.4 Zasiјavanje

Preporučene podloge i vrijeme inkubacije dati su u tabeli br.5

Ručni metod - kalibrisanom ezom, zasiјavanje površinskim linijama.

- pažljivo promućkati urin da se izbjegne pjenušanje
- uroniti kraj sterilne, kalibrisane eze (1 μ l, 2 μ l, 10 μ l) u urin odmah ispod površine i izvući vertikalno vodeći računa da ne bude urina van omče
- inokulisati podlogu i razvući, najviše 2 uzorka na ploči prečnika 9 cm, ezom od 10 μ l
- Broj bakterija u 1 ml urina se određuje prema tabeli br.3

TABELA 3. Vodič za određivanje broja bakterija u 1 ml urina ručnim metodom / kalibrisanom ezom / i multipoint metodom /

cfu/ml	Broj cfu koristeći inokulum od				
	0.3 μ l	1 μ l	2 μ l	5 μ l	10 μ l
1000	-	-	-	5	10
10 000	3	10	20	50	100
100 000	30	100	200	500	1000

Filter papir metod – ovaj metod je senzitivn za ispitivanje urina sa više od 10 000 cfu/ml

- uroniti komercijalno pripremljen sterilan filter papir u urin do oznake
- odstraniti suvišni urin prevlačenjem ivice filter papira uz stranu posude sa urinom i pustiti da se preostali urin apsorbuje u papir prije inokulacije podloge
- pritisnuti papir na agar nekoliko sekundi
- Broj bakterija u 1 ml urina se određuje prema tabeli br.4.

TABELA 4. Vodič za određivanje broja bakterija u 1 ml urina filter papir metodom

Broj poraslih kolonija		Odgovarajući cfu/ml
Bacili	Koke	
0 – 5	0 – 8	≥ 10 000
5 - 25	8 – 30	10 000 – 100 000
≥ 25	≥ 30	≥ 100 000

Multipoint metod - SPA, drugi hirurški uzeti urini i urini u kojima se očekuje manje od 100 cfu/ml

- inokulisati 100 µl (0.1 ml) uzorka aseptično na cijelu Endo agar (CLED agar) ploču
- za izolaciju pojedinačnih kolonija, razvući inokulum sterilnom ezom ili štapićem po cijeloj površini ploče
- cfu/ml = broj poraslih kolonija x10
- Broj bakterija u 1 ml urina se određuje prema tabeli br.3

16.5 Posebne situacije

Sumnja na crijevne groznice

- pažljivo dodati jednaku količinu (5 - 10 ml) necentrifugiranog urina u 5 - 10 ml dvostruke koncentracije manitol selenita.

Određivanje antimikrobnih supstanci

- ploču sa *B. subtilis*, *E. coli* ili *S. aureus* inokulisati ispitivanim urinom (*B. subtilis* je pogodniji zbog svoje osjetljivosti na širi spektar antibiotika. Ovu ploču zasijati poslednju, da se izbjegne zagađenje *B. subtilis*-om)

16.6 Inkubacija

TABELA 5. Podloga, uslovi i očekivani organizmi

Klinički detalji	Standardna podloga	Inkubacija			Očekivani organizam
		°C	atmos.	Vrijeme čitanje	
IUT	CLED agar /endo agar / krvni agar	35-37	aerobno	16-24 h ≥ 16 h	<i>Enterobacteriaceae</i> Enterococci Lancfield Group B. streptokoka <i>Pseudomonas</i> <i>S. saprophyticus</i> Druge koagulaza neg. staf <i>S. aureus</i>

Klinički detalji	Standardna podloga	Inkubacija				Očekivani organizam
		°C	atmos.	Vrijeme čitanje		
Crijevne groznice	Dvostruka konc. manitol selenit bujona	35-37	aerobno	16-24	≥ 16	<i>S. typhi</i> <i>S. paratyphi</i>
	↓ subkultura na SS	35-37	aerobno	16-24	≥ 16	

Za situacije:

Susp. gljivična infekcija	Sabouraud agar	35-37	aerobno	40-48	≥ 40	Gljivice
Ispitivanje prisustva antimikrobnih supstanci	MH agar sa <i>B. subtilis</i> (više uzoraka na jednoj ploči)	35-37	aerobno	16-24	≥ 16	Antimikrobne supstance
Sterilna piuria Nema antimikr. sredstava	Podloga za anaerobe	35-37	aerobno	40-48	≥ 40	Anaerobi
	Čokoladni agar	35-37	5–10 % CO ₂	40-48	≥ 40	Osjetljivi organizmi

16.7 Tumačenje nalaza

Tumačenje nalaza dato je u tabeli br.6.

TABELA 6. Tumačenje nalaza urinokulture

Porast cfu/ml	Broj izolovanih vrsta mikroorganizama	Tip uzorka	Klinički detalji	Tumačenje rezultata	Potreban test osjetljivosti	Sugestije
>100.000	1	Svi	Nema	Vjerovatna IUT	Da	Ponoviti ako je uzorak star ili nema piurije. Ako je iz kese predložiti SPA, CCU.

Porast cfu/ml	Broj izolovanih vrsta mikroorganizama		Tip uzorka	Klinički detalji	Tumačenje rezultata	Potreban test osjetljivosti	Sugestije
	2	Bilo koji organizam u broju ≥ 100.000 ili > 10.000	MSU, CCU, SCU, BAG,	Le Simptomi	- Moguća IUT - kolonizacija ako je loše uzimanje ili transport	Da	Ponoviti zbog potvrde
			CSU	Stalni kateter Neurološka bešika	Vjerovatna kolonizacija	Ne - čuvati ploču 5 dana ako pacijent postane septičan	Razmotriti ako pacijent ima stalni kateter ili zahtijeva terapiju
	2 ili 3	1 organizam predomina u broju > 100.000 ili > 10.000	Svi	Nema	Moguća IUT	Da, predominantan organizam	Ponoviti ako je uzorak star ili nema piurije Ako je iz kese predložiti SPA, CCU
	≥ 3	Miješani rast – nema dominantnog soja	Svi	Nema	Nepravilno uzimanje ili transport	Ne	Ponoviti – ako ima simptome
10.000 – 100.000	1		Svi	Le Simptomi	Vjerovatno IUT	Da	Ponoviti zbog potvrde
	2	1 predominantan u ≥ 10.000	Svi	Le Simptomi Djeca	Vjerovatno IUT predominantnom vrstom Drugi izolat vjerovatno kontaminacija	Da, predominantni organizam	Ponoviti ili SPA / CCU
		1 u < 10.000 ili u 10.000-100.000 ali ne dominira		Nema	Vjerovatna kontaminacija	Ne	Miješana kultura, vjerovatno kontaminacija
	≥ 3	1 predomina u ≥ 10.000	Svi	Le Simptomi	Vjerovatno IUT dominantnim sojem	Ne – čuvati ploče do 5 dana	Miješana kultura – ponoviti ako ima simptome

Porast cfu/ml	Broj izolovanih vrsta mikroorganizama		Tip uzorka	Klinički detalji	Tumačenje rezultata	Potreban test osjetljivosti	Sugestije
		Sve kombinacije	Kateter	Stalni kateter Neurološka bešika	Kolonizacija	Ne – čuvati ploče do 5 dana	Razmotriti ako je potrebna terapija
1.000 – 10.000	1		MSU, CCU, CSU, IL	Žene sa simptomima Prostatitis Le	Vjerovatna IUT – potrebna klinička ispitivanja	Da	Ponoviti da se potvrdi
	2	Svaka vrsta \geq 1000 uključujući E. coli ili S. saproph	Svi		Vjerovatna IUT – potrebna klinička ispitivanja	Da	Ponoviti da se potvrdi
100 – 10.000	1		SPA, CYS, SCU	Nema	Vjerovatno IUT	Da	
	2	Svaki organizam \geq 100		Le	Vjerovatno IUT	Da	
	\geq 3	1 organizam \geq 1000		Le	Vjerovatno IUT	Da, predominantan organizam	Miješani rast, ponoviti
Nema porasta		< 1000 ezom od 1 μ l < 100 ezom od 10 μ l	Svi	Nema ili je pacijent asimptomatičan	Nema IUT		
				Simptomatski perzistentna piurija	Pacijent na antibioticima ? Moguća <i>Chlamydia</i> Osjetljivi organizmi		Preporučiti dalje ispitivanje
MSU – Srednji mlaz, CCU – clean catch, BAG – urin iz kese, SPA – suprapubčni aspirat, CSU – kateter, SCU – jedna kateterizacija CYS – cistoskopski urin							

17 Ispitivanje vaginalnog brisa

17.1 Uzorkovanje

- Uz pomoć spekuluma brisom se uzima sekret zadnjeg forniksa vagine.

17.2 Transportovanje

Što je prije moguće (najduže za dva časa). Ako je brz transport nemoguć:

- koristiti transportnu podlogu, ili
- na dno epruvete ukapati jednu do dvije kapi sterilnog fiziološkog rastvora, a bris sa materijalom potisnuti do dna da apsorbuje ukapanu tečnost. Na ovaj način transport može biti odložen i za nekoliko sati, jer je spriječeno isušivanje bakterija na šta su one najosjetljivije.
- Ovako pripremljen materijal se čuva na sobnoj temperaturi.

17.3 Zasiјavanje

17.3.1 Direktan mikroskopski preparat

- dva mikroskopska preparata – jedan bojen po Gram-u; drugi za neko od dodatnih bojenja, po potrebi
- izvjestiti o postojanju blastospora, leukocita i eventualnom prisustvu intracelularnih Gram «-» diplokoka
- izvjestiti opisno uočene mikroorganizme
- izvjestiti o postojanju «clue» ćelija†
- izvjestiti da li mikroskopski preparat sugeriše bakterijsku vaginozu (BV) – na osnovu jedne od dvije šeme:

Šema po Nugentovim kriterijumima:

BROJ LAKTOBACIL A† PO VIDNOM POLJU	REZULTAT	BROJ GARDNERELL A* PO VIDNOM POLJU	REZULTAT	BROJ MOBILUNCUS § PO VIDNOM POLJU	REZULTAT
> 30	0	> 30	4	> 30	4
5 – 30	1	5 – 30	3	5 – 30	3
2 – 4	2	2 – 4	2	2 – 4	2
1	3	1	1	1	1
Nijedan	4	Nijedna	0	Nijedan	0

Zbir sva 3 rezultat 0 – 3

fiziološka mikroflora

Zbir sva 3 rezultat 4 – 6

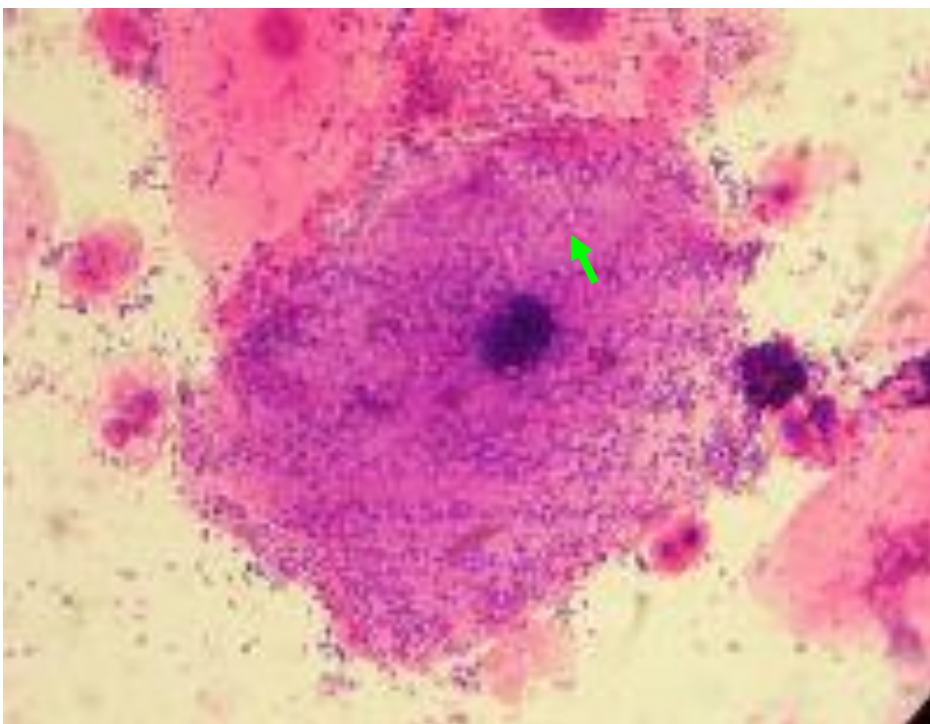
djelimično izmjenjena mikroflora: ukazuje na moguću BV; na osnovu kliničkih kriterijuma ponovo poslati na analizu radi potvrde BV

Zbir sva 3 rezultat 6 – 10

izmjenjena mikroflora: indikovana bakterijska vaginoza

†*Lactobacillus* - veliki gram pozitivni bacili**Gardnerella vaginalis* - mali gram labilni bacili§*Mobiluncus* - savijeni gram negativni ili gram labilni bacili

‡«clue» ćelije su epitelijalne ćelije prekrivene Gram varijabilnim kokobacilima i bacilima (slika br.1)



SLIKA 1. Preparat bojen po Gram-u: «clue» ćelija

(Izvor: <http://pedagogie.ac-montpellier.fr/Disciplines/sti/biotechn/frottisvaginal.htm>)

Šema po Hejsovim kriterijumima:

I stepen	Fiziološka mikroflora	preovladava <i>Lactobacillus</i> (Gram pozitivni štapići)
II stepen	Djelimično izmijenjena mikroflora	miješani laktobacili sa drugim morfotipovima bakterija; na osnovu kliničkih kriterijuma ponovo poslati na analizu radi potvrde BV
III stepen	Izmjenjena mikroflora	malobrojni ili potuno odsutni laktobacili, ali veliki broj Gram labilnih kokobacila tipa <i>Gardnerella vaginalis</i> i drugih morfotipova bakterija; ukazuje na BV

17.3.2 Kultivacija

- krvni agar
- endo agar

17.4 Inkubacija

- krvni agar: aerobno, 35 - 37°C, 16-24 h
- endo agar: aerobno, 35 - 37°C, 16-24 h

17.5 Tumačenje nalaza

- Fiziološka mikroflora: *Lactobacillus* – ne referiše se
- Oportunistička flora:
 - *Gardnerella vaginalis* – kultiviše se po potrebi, samo kod trudnica
 - *Streptococcus agalactiae*
 - Anaerobne gram negativne bakterije – ne kultivišu se rutinski
 - *Candida spp.*
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Enterococcus spp.*
 - Enterobakterije
- Mogući patogeni:
 - *Trichomonas vaginalis* – ispitivanje posebno opisano u ovom poglavlju
 - *Candida spp.*
 - *Neisseria gonorrhoeae*
 - *Streptococcus β haemolyticus* grupa A, C i G

17.6 Izvještavanje

U slučaju da nisu izolovani klinički značajni mikroorganizmi, izvijestiti:
Izolovana fiziološka mikroflora.

18 Ispitivanje cervikalnog brisa

18.1 Uzorkovanje

- Cervikalni bris se uzima iz endocervikalnog kanala nakon uklanjanja sluzi sa površine grlića materice tupferom ili većim brisom. Vrh manjeg **dakronskog** brisa se uvuče nekoliko milimetara u cervikalni kanal, zarotira kako bi se dobile cervikalne ćelije i eksudat i pažljivo izvuče van, vodeći računa da se pri tome ne dodirnu zidovi vagine
- Ukoliko se istovremeno ispituje na prisustvo mikoplazmi i hlamidija redosljed je sljedeći:
 - Prvi bris – za kulturno ispitivanje bakterija (osim mikoplazmi i hlamidija)
 - Drugi bris – za kulturno ispitivanje mikoplazmi
 - Treći bris – za ispitivanje prisustva hlamidijalnih antigena (DIF ili ELISA)

18.2 Transportovanje

- Ukoliko se ne zasijava odmah, transportuje se u transportnoj podlozi.

18.3 Zasijavanje

18.3.1 Direktan mikroskopski preparat

- dva mikroskopska preparata – jedan bojen po Gram-u; drugi za neko od dodatnih bojenja, po potrebi
- izvijestiti o postojanju blastospora, leukocita i eventualnom prisustvu intraceularnih Gram «-« diplokoka
- izvijestiti opisno uočene mikroorganizme

18.3.2 Kultivacija

- krvni agar
- endo agar
- VCN čokoladni agar

18.4 Inkubacija

- krvni agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h
- endo agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h
- VCN čokoladni agar: u uslovima sa 5-10% CO₂, 40-72 h (svakodnevno čitanje)

18.5 Tumačenje nalaza

- Mogući patogeni:
 - *Neisseria gonorrhoeae*
 - *Chlamydia trachomatis* (obrađeno u protokolu za virusološke i serološke analize)
 - *Mycoplasma hominis*
 - *Ureaplasma urealyticum*
- Drugi mikroorganizmi koji mogu biti značajni:
 - *Streptococcus β haemolyticus*
 - Druge streptokoke
 - *Enterococcus spp.*
 - Enterobakterije
 - *Haemophilus spp.*
 - *Listeria spp.*
 - *Pseudomonas spp.*
 - *Staphylococcus aureus*
 - Gljivice.
- Mogući patogeni kod žena sa puerperalnom sepsom, sepsom poslije abortusa, kod pelvične upalne bolesti i kod trudnica.
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus β haemolyticus*
 - *Enterococcus spp.*
 - Enterobakterije
 - Anaerobne Gram negativne bakterije
 - *Clostridium spp.*
 - *Listeria monocytogenes*

18.6 Izvještavanje

Ukoliko nije uočen porast mikroorganizama izvijestiti: *Zasijane podloge ostale su sterilne.*

19 Ispitivanje uretralnog brisa

19.1 Uzorkovanje

- Pacijentu se savjetuje da najmanje 2 h prije uzimanja uretralnog brisa ne urinira.
- Kod sumnje na gonoreju, može biti od koristi uzimanje uzorka prije prvog jutarnjeg uriniranja.
- Ukoliko postoji spontana sekrecija, uzima se kap sekreta pomoću brisa.
- Ako nema vidljive sekrecije, treba obrisati okolinu uretralnog otvora brisom natopljenim sterilnim fiziološkim rastvorom, a potom malim urogenitalnim **dakronskim** brisom ući u uretralni kanal 2-4 cm i ostaviti ga par sekundi kako bi se natopio eksudatom.
- Kod sumnje na hlamidijalnu infekciju sterilan bris se uvlači u uretru 2-4 cm i rotira 10-tak sekundi kako bi se dobilo što više epitelnih ćelija iz uretralnog kanala.
- Ukoliko se istovremeno ispituje na prisustvo mikoplazmi i hlamidija redosljed je sljedeći:
 - Prvi bris – za kulturelno ispitivanje bakterija (osim mikoplazmi i hlamidija)
 - Drugi bris – za kulturelno ispitivanje mikoplazmi
 - Treći bris – za ispitivanje prisustva hlamidijalnih antigena (DIF ili ELISA) – obrađeno u protokolu za virusološke i serološke analize

19.2 Transportovanje

- Ukoliko se ne zasijava odmah, bris se transportuje u transportnoj podlozi

19.3 Zasiјavanje

19.3.1 Direktna mikroskopska preparata

- dva mikroskopska preparata – jedan bojen po Gram-u; drugi za neko od dodatnih bojenja, po potrebi
- izvјestiti o postojanju blastospora, leukocita i eventualnom prisustvu intraleukocitarnih Gram «-« diplokoaka
- izvјestiti opisno uočene mikroorganizme

19.3.2 Kultivacija

- krvni agar
- endo agar
- VCN čokoladni agar

19.4 Inkubacija

- krvni agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h
- endo agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h
- VCN čokoladni agar: u uslovima sa 5-10% CO₂, 40-72 h (svakodnevno čitanje)

19.5 Tumačenje nalaza

- Mogući patogeni:
 - *Neisseria gonorrhoeae*
 - *Chlamydia trachomatis* – obrađeno u protokolu za virusološke i serološke analize
 - *Streptococcus pyogenes*
 - *Trichomonas vaginalis*
 - *Ureaplasma urealyticum*
 - *Mycoplasma hominis*
- Drugi mikroorganizmi koji mogu biti značajni:
 - *Streptococcus β haemolyticus*
 - Druge streptokoke
 - *Enterococcus spp.*
 - Enterobakterije
 - *Haemophilus spp.*
 - *Listeria spp.*
 - *Pseudomonas spp.*
 - *Staphylococcus aureus*, gljivice.

19.6 Izvještavanje

U slučaju da nisu izolovani klinički značajni mikroorganizmi, izvjestiti: *Izolovana samo fiziološka mikroflora.*

20 Ispitivanje prisustva genitalnih mikoplazmi

20.1 Uzorkovanje

- Može se koristiti vaginalni, cervikalni ili uretralni bris

20.2 Zasiјavanje

- Gotove komercijalne podloge za izolaciju mikoplazmi – transport, inkubacija i tumačenje rezultata – prema uputstvu proizvođača

21 Identifikacija *Staphylococcus* spp.

21.1 Uvod

- Rod *Staphylococcus* obuhvata više od 30 vrsta, a stafilokoki koji su najčešće povezani sa infekcijama kod čovjeka su:
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Staphylococcus epidermidis*
 - *Staphylococcus saprophyticus*
- *Staphylococcus* species koje mogu izazvati infekcije kod ljudi:
 - *Staphylococcus capitis*
 - *Staphylococcus hominis*
 - *Staphylococcus haemolyticus*
 - *Staphylococcus lugdunensis*
 - *Staphylococcus saccharolyticus*
 - *Staphylococcus warneri*
 - *Staphylococcus caprae*
 - *Staphylococcus hyicus*
 - *Staphylococcus intermedius*
 - *Staphylococcus schleiferi*
 - *Staphylococcus simulans*
- Druge vrste bliske ovom rodu koje mogu izazvati infekcije kod čovjeka:
 - *Micrococcus luteus*
 - *Rothia mucilaginosus* (ranije *Micrococcus mucilaginosus*)

21.2 Izolacija

- krvni agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h

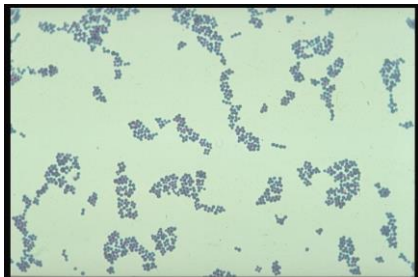
21.3 Identifikacija

Kulturelne osobine

Kolonije su okrugle, glatke, sjajne površine, ravnih ivica, blago konveksne, pigmentisane, bijele ili krem boje, ponekad žute pa i narandžaste, promjera 1-2 mm, mogu pokazivati hemolizu. Ezom se razmazuju po podlozi («kao maslac»).

Mikroskopske osobine u preparatu sa kulture

Gram-pozitivne koke pojedinačno, u parovima, tetradama i grozdovima (slika br.2).



SLIKA 2. *Staphylococcus aureus* – bojenje po Gram-u

Izvor:

<http://www.geocities.com/capecanaveral/3504/gallery.htm>
from Neal Chamberlain: Photo Gallery of Bacterial Pathogens

Ispitivanje fiziološko-biohemijskih osobina

Modifikovani oksidaza test

Test se izvodi sa 6% rastvorom tetra-metil-fenilen-diamina u dimetil sulfoksidu i diferencira stafilokoke (oksidaza negativne) od mikrokoka (oksidaza pozitivni).

Katalaza test

Stafilokoki su katalaza pozitivni, a streptokoke katalaza negativne. Test se izvodi sa odabranim bakterijskim kolonijama poraslim na čvrstoj podlozi. Ne treba raditi sa kolonijama poraslim na podlogama koje sadrže intaktne eritrocite (krvni agar). Kolonije sa čokoladnog agara mogu se upotrebiti za testiranje.

Reagens je 3-5% hidrogen peroksid. On je nestabilan i treba ga čuvati u frižideru. Izbjegavati svako nepotrebno izlaganje svjetlosti.

Izvođenje:

- staviti jednu kap hidrogen peroksida na predmetno staklo
- mali dio suspektne kolonije nanijeti na centar pokrovnog stakalceta
- obrnuti pokrovno stakalce i staviti na kap hidrogen peroksida na pločici
- posmatrati stvaranje mjehurića unutar 10 sek. Koristiti lupu ako je potrebno za gledanje vrlo slabe produkcije katalaze.

Koagulaza test

Vrste roda *Staphylococcus* se diferenciraju prema sposobnosti da koagulišu plazmu pomoću enzima koagulaze. *Staphylococcus aureus* je koagulaza pozitivan.

Vezana koagulaza se određuje testom na pločici, a slobodna testom u epruveti.

Reagensi i oprema: test rastvor – komercijalna plazma (sa EDTA) za test na pločici, odnosno za test u epruveti, bakteriološka omča i Pasterove pipete.

Pozitivna kontrola: *Staphylococcus aureus* NCTC 6751

Negativna kontrola: *Staphylococcus epidermidis* NCTC 4276

Izvođenje koagulaza testa na pločici:

- Staviti kap destilovane vode na pločicu.
- Napraviti suspenziju ispitivanog soja da bude homogena i gusta. (Lažno negativna reakcija se može dobiti ako suspenzija nije dovoljno gusta. Pogledati da nema autoaglutinacije. Sojevi koji pokazuju autoaglutinaciju moraju biti testirani drugim metodama.)
- Uzeti ezom plazmu i izmiješati je lagano sa homogenom suspenzijom.

Pozitivan rezultat – vidljivo stvaranje grudvica unutar 10 sek.

Negativan rezultat – nema vidljivog stvaranja grudvica.

Postoje komercijalni kitovi koji sadrže npr. lateks čestice senzibilisane sa IgG (monoklonsko anti-*Staph. aureus* antitijelo) i eritrocite obložene humanim fibrinogenom. *Staphylococcus aureus* u ovoj suspenziji se proteinom A vezuje za Fc fragment IgG na površini lateks čestica, a clumping faktorom reaguje sa fibrinogenom na površini eritrocita. Ovo dovodi do pojave grudvica, odnosno aglutinacije. Test je zbog navedenog osjetljiviji od klasičnog koagulaza testa na pločici.

Izvođenje koagulaza testa u epruveti:

- Staviti u epruvetu oko 1 ml komercijalne plazme pogodne za ovaj test.
- Suspendovati ispitivanu koloniju u plazmi.
- Inkubirati na 35-37°C i očitavati nakon 4 h.
- Uočiti koagulum koji zahvata čitav sadržaj epruvete ili formira slobodnu opnu fibrina. Ako je negativan, inkubirati preko noći na 22-25°C.

Pozitivan rezultat: stvaranje koaguluma unutar 4h na 37°C ili nakon inkubacije preko noći na 22-25°C.

Negativan rezultat: nema koaguluma nakon 4h odnosno 24h.

Kod negativnog koagulaza testa na pločici obavezno uraditi test u epruveti!

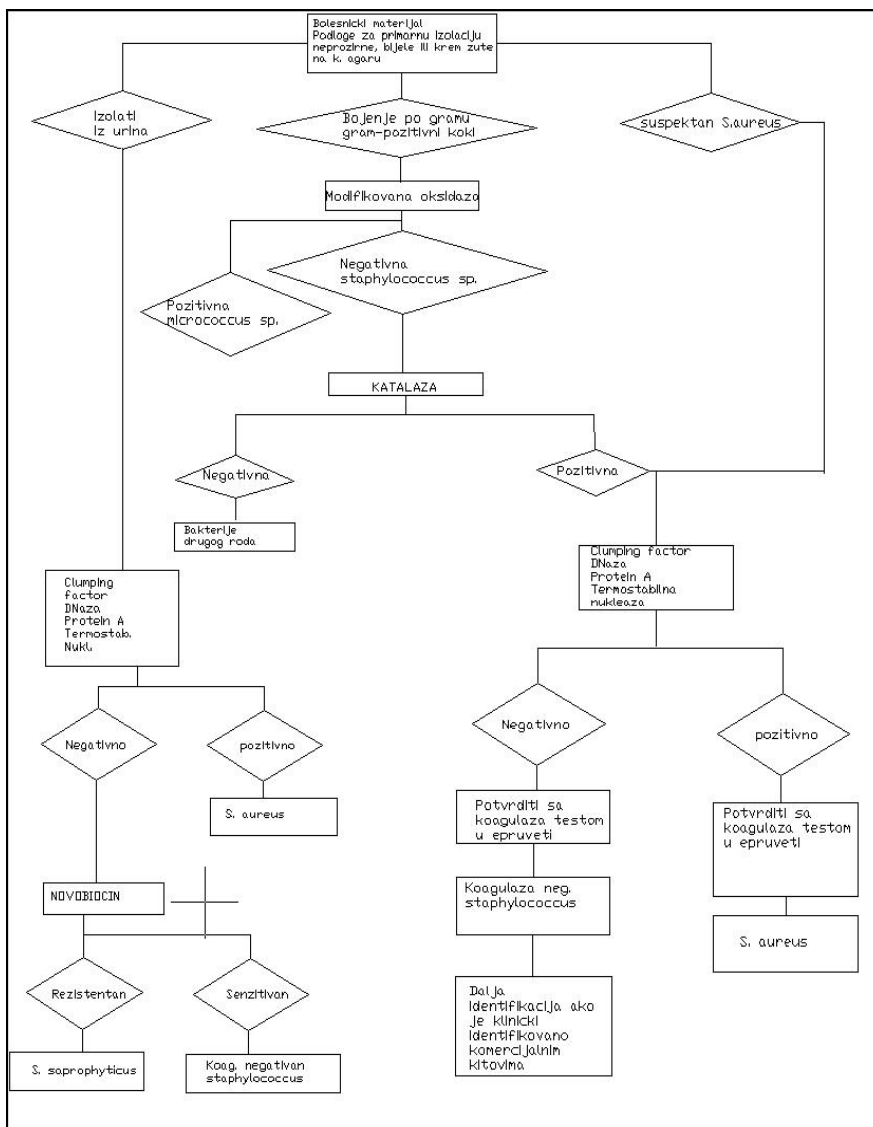
Novobiocin test

Koristi se u diferenciranju *Staphylococcus saprophyticus* (novobiocin rezistentan) od ostalih koagulaza negativnih stafilocoka (novobiocin senzitivni).

Komercijalni testovi za biohemijsko ispitivanje stafilocoka

Identifikacija koagulaza negativnih stafilocoka pomoću ovih kitova vrši se samo ako je to klinički indikovano.

Izolovani soj se može poslati u referentnu laboratoriju zasijan na krvni agar ili kosi hranljivi agar.



HEMA 1. Redosljed postupaka u identifikaciji *Staphylococcus spp.*

22 Identifikacija *Streptococcus* spp. i *Enterococcus* spp.

22.1 Uvod

Rod *Streptococcus* obuhvata heterogenu grupu Gram pozitivnih, katalaza negativnih koka koje su odgovorne za brojne infekcije kod čovjeka, a takođe su i dio fiziološke mikroflore.

- Najznačajnije vrste izazivači oboljenja kod čovjeka:
 - *Streptococcus β haemolyticus* gr. A, B, C, G
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - *Streptococcus anginosus* grupa: *S. anginosus*, *S.constellatus* i *S. intermedius*
 - *Streptococcus bovis*
 - Viridans streptokoki (*S. mutans*, *S.sanguis*, *S. mitis* i dr.)
 - *Enterococcus faecalis* (od 1984. izdvojen iz streptokoka u poseban rod *Enterococcus* zajedno sa *Enterococcus faecium*)

22.2 Izolacija

- krvni agar: aerobno, 35-37°C, 16-24 h

22.3 Identifikacija

22.3.1 Kulturelne osobine

Kolonije su sitne, sivkaste ili prozračne, konveksne i kompaktne. Kolonije *Streptococcus pneumoniae* imaju centralno udubljenje (zbog aktivacije autolizina). Neki sojevi zahtijevaju za rast prisustvo ugljen dioksida.

Na krvnom agaru streptokoki pokazuju jedan od tri tipa hemolize:

Alfa – zelenkasta zona hemolize oko kolonija zbog djelimične destrukcije eritrocita i redukcije hemoglobina u eritrocitima (*Streptococcus pneumoniae* i većina viridans streptokoka, *Enterococcus spp.*)

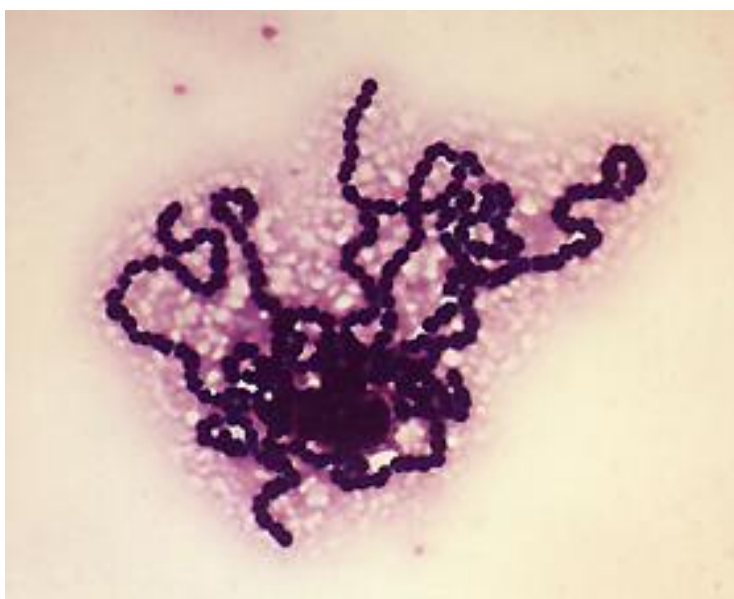
Beta - prozirna zona oko kolonija zbog potpune destrukcije eritrocita (*Streptococcus β haemolyticus* gr.A, B, C,G). *Streptococcus agalactiae* (streptokok gr.B) ima usku zonu hemolize oko kolonije, kolonije su nešto sjajnije i nisu kompaktne.

Gama – nema hemolize (*Enterococcus spp.*)

Kolonije *Enterococcus spp.* mogu imati zonu α hemolize ili biti bez hemolize, sivkaste su, sjajne i nisu kompaktne (razmazuju se ezom).

22.3.2 Mikroskopske osobine u preparatu sa kulture

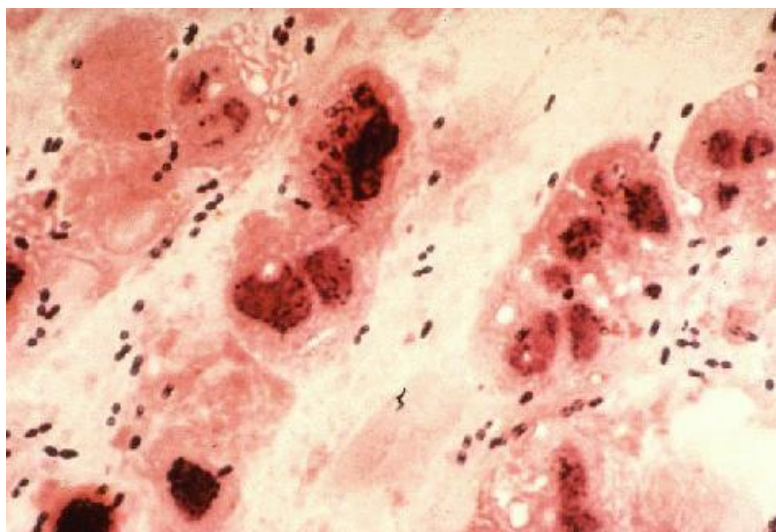
Streptokoki su Gram-pozitivni koki, okrugli ili ovoidni, dijametra 0,6-1 μm , raspoređeni u parovima i lancima različite dužine, posebno u tečnim podlogama (slika br.3). Dijagnostički je značajan direktni preparat od materijala iz primarno sterilnih regija, briseva rana, piodermija i sl., ali ne i sa mjesta gdje se streptokoke nalaze kao dio fiziološke mikroflore.



SLIKA 3. Streptokoke grupisane u vidu dugih lanaca – bojenje po Gram-u
(Izvor: <http://www.geocities.com/capecanaveral/3504/gallery.htm> from Neal Chamberlain: Photo Gallery of Bacterial Pathogens)

Streptococcus pneumoniae je diplokok sa jednim oštrijim polom (oblik plamena svijeće), ili je u kraćim lancima, sa kapsulom u direktnom preparatu. Direktni preparat sputuma kod sumnje na pneumokoku pneumoniju sa leukocitima i streptokokima pomenutog izgleda zato ima dijagnostičku vrijednost (slika br.4).

Starija kultura streptokoka (koja je prešla logaritamsku fazu rasta) gubi Gram pozitivnost.



SLIKA 4. *Streptococcus pneumoniae* u direktnom preparatu sputuma
(Izvor: <http://www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/S.pneumoniae1.jpg>)

22.3.3 Ispitivanje fiziološko-biohemijskih osobina

Katalaza test

Negativan za sve streptokoke.

Bacitracin test

Osnovni je dijagnostički test za identifikaciju *Streptococcus pyogenes*-a. Radi se samo sa beta-hemolitičkim streptokokama (i *S. pneumoniae* može biti osjetljiv na bacitracin), a koristi se test disk bacitracina od 0,04 U.

Pikira se nekoliko kolonija beta-hemolitičkog streptokoka i ezom zasijava krvni agar da se dobije gust, konfluentan rast. Postavlja se test disk ili test tableta bacitracina i inkubira preko noći. Zatim se mjeri prečnik zone inhibicije. Ako je veći od 15 mm test je pozitivan. Treba imati u vidu da su određeni sojevi streptokoka gr. A (do 10%) rezistentni na bacitracin i da su neki streptokoki gr. C i G osjetljivi na bacitracin (3-5%).

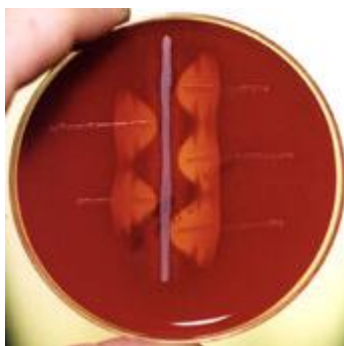
Osjetljivost na trimetoprim/sulfamethoxazol

Može se izvoditi zajedno sa bacitracinskim testom jer je važan za diferenciranje grupa beta-hemolitičkog streptokoka C, F i G (senzitivne) od A i B (rezistentne). Prečnik zone inhibicije veći od 18 mm smatra se pozitivnim.

CAMP test (Christie, Atkins, Munch-Petersen)

Ovim testom se otkriva prisustvo CAMP faktora – difuzibilnog proteina koji pojačava beta –hemolizu *Staphylococcus aureus*-a. Pozitivan je kod *Streptococcus agalactiae* (gr.B).

Na krvnu ploču zasijava se najprije *Staphylococcus aureus* u vidu crte, a zatim okomito na nju zasijava se ispitivani soj streptokoka u vidu crte počevši od kraja ploče do blizu stafilokokne crte. Za izvođenje ovog testa potreban je soj *Staphylococcus aureus*-a sa dvostrukom zonom hemolize (slika br.5).



SLIKA 5. CAMP test koji se izvodi sa sojem *Staphylococcus aureus*-a sa dvostrukom zonom hemolize

Nakon inkubacije preko noći posmatra se da li je u blizini stafilokokne crte došlo do kopljastog pojačanja hemolize streptokoka.

Komercijalni testovi za serološku identifikaciju grupe

Koriste se za beta-hemolitične streptokoke koje su bacitracin rezistentne, trimethoprim/sulfamethoxazol osjetljive (*Streptococcus β haemolyticus* gr.C, G i F) radi identifikacije grupe.

Optohin test

Osnovni je test za diferenciranje *Streptococcus pneumoniae* od ostalih alfa-hemolitičkih streptokoka.

Izvodi se za alfa-hemolitičke streptokoke zasijavanjem na krvnu ploču pomoću eze tako da se dobije konfluentan rast, a zatim se postavlja test disk ili test tableta sa optohinom (5μg) i inkubira preko noći na 37°C, u atmosferi sa 5-10 % CO₂.

Optohin = etilhidrokuprein hidrohlorid (derivat kinina).

Test je pozitivan ako je zona inhibicije rasta veća od one koju je proizvođač test diska ili tablete u uputstvu naznačio, negativan ako je manja.

Hidroliza eskulina u 40 % žuči

Zasijava se kosi eskulin-žučni agar ispitivanim sojem i inkubira preko noći.

Ukoliko dođe do hidrolize eskulina podloga mijenja boju u crnu (reakcija nastalog eskuletina sa feri-citratom u podlozi).

Pozitivan je kod enterokoka i beta-hemolitičkog streptokoka grupe D.

Rast u prisustvu 6,5% NaCl

Ispitivani soj se zasijava u epruvetu sa podlogom koja sadrži visoku koncentraciju NaCl (6,5%) i inkubira preko noći. Zamućenost podloge nakon inkubacije znak je pozitivnog rezultata, a ako podloga ostane bistra rezultat je negativan. Test je pozitivan kod enterokoka.

Komercijalni testovi za biohemijsku identifikaciju

Koriste se za identifikaciju ostalih α hemolitičnih streptokoka (optohin rezistentnih, eskulin negativnih) do nivoa vrste ukoliko ta identifikacija ima kliničkog značaja. U protivnom se mogu identifikovati kao *Streptococcus α haemolyticus spp.*

TABELA 7. Redosljed postupaka u identifikaciji streptokoka i enterokoka*

Dijagnostički i kriterijum-test	<i>S.pyogene</i> s	<i>S.agalactiae</i> e	BHS gr.C , G, F	<i>Enterococcus</i> s	BH S gr.D	<i>S.pneumoniae</i> e	Viridans streptokok e
Hemoliza	β	β	β	α, γ	α, γ	α	α
Osjetljivost na bacitracin	S	R	R	R	/	/	/
Osjetljivost na STX	R	R	S	R	/	/	/
Osjetljivost na optohin	/	/	/	R	R	S	R
CAMP test	-	+	-	-	-	-	-
Hidroliza eskulina u 40% žuči	/	/	/	+	+	-	-
Rast u prisustvu 6.5% NaCl	/	/	/	+	-	-	-
Grupa po Lancfield-ovoj	A	B	C, G, F	D	D	Nema grupnog antigena	Nema grupnog antigena

* Objašnjenje tabele:

- Uočiti suspektne kolonije na hranljivim podlogama i definisati tip hemolize.

- Napraviti preparat sa kulture (Gram-pozitivni koki) i katalaza test (negativan).
- U slučaju beta-hemolitičkih streptokoka, ukoliko raspoložemo sa komercijalnim testovima za serološku identifikaciju, uraditi serološku identifikaciju grupe i identifikovati kao *Streptococcus pyogenes* (grupa A), *Streptococcus agalactiae* (grupa B) ili beta hemolitički streptokok grupe C, F ili G.
- Ukoliko ne raspoložemo ovim testovima uraditi: bacitracinski test, test osjetljivosti na trimethoprim/sulfamethoxazol (SXT) i CAMP test. Identifikovati:
 - *Streptococcus pyogenes* (bacitracin pozitivan, SXT negativan)
 - *Streptococcus agalactiae* (bacitracin negativan, SXT negativan, CAMP pozitivan).
 - *Streptococcus β haemolyticus non A non B* (bacitracin negativan, SXT pozitivan, CAMP negativan).
- U slučaju alfa-hemolitičkih streptokoka suspektnih kolonija uraditi optohinski test i ako je pozitivan identifikovati kao *Streptococcus pneumoniae*.
- U slučaju optohin negativnih alfa-hemolitičkih kolonija ili nehemolitičkih kolonija uraditi test hidrolize eskulina. Ako je test hidrolize eskulina pozitivan, kao i test rasta u prisustvu 6.5% NaCl, identifikovati kao *Enterococcus spp.* Ako je test hidrolize eskulina pozitivan, a test rasta negativan identifikovati kao *Streptococcus bovis*, ukoliko se komercijalnim testovima za serološku identifikaciju potvrdi grupa D. Ukoliko se serološki ne potvrdi identifikovati *Streptococcus spp.* ukoliko je soj vankomicin osjetljiv. Vankomicin rezistentne sojeve identifikovati kao *Leuconostoc spp.* Optohin negativni i eskulin negativni alfa-hemolitički sojevi streptokoka mogu se identifikovati kao *Streptococcus spp.* (grupa viridans).

22.4 Komentar

Serološka klasifikacija streptokoka je zasnovana na antigenim razlikama polisaharidnog antigena ćelijskog zida (C supstanca ili grupni karbohidratni antigen) i dijeli streptokoke na grupe. Od medicinskog značaja su grupe: A, B, C, D, F i G. *Streptococcus pneumoniae* nema grupni antigen.

Viridans streptokoki je termin za alfa-hemolitičke streptokoke koji su takođe bez grupnih antigena.

23 Identifikacija *Neisseria* spp. i morfološki sličnih organizama

23.1 Uvod

- *Neisseria* spp. koje izazivaju oboljenja kod ljudi:
 - *N. gonorrhoeae*
 - *N. meningitidis*
 - I druge najserije mogu biti povezane sa oboljenjima kod ljudi.
- Najserijama slične vrste od kojih neke izazivaju oboljenja kod ljudi (imena su im ispisana pojačanim slovima)
 - ***Moraxella catarrhalis***
 - *Moraxella lacunata*
 - *Moraxella atlantae*
 - *Moraxella nonliquefaciens*
 - *Moraxella osloensis*
 - ***Kingella dentrificans***
 - *Kingella kingae*
 - *Gemella haemolysans*
 - *Gemella morbillorum*
 - *Veillonella dispar*
 - *Veillonella parvula*

23.2 Izolacija

- Obogaćeni čokoladni agar: u uslovima sa 5 – 10 % CO₂, 35–37° C, 40–48 h (svakodnevno čitanje)
- VCN čokoladni agar (za *N.gonorrhoeae* iz primarno nesterilnih uzoraka): u uslovima sa 5 – 10 % CO₂, 35–37° C, 40–48 h (svakodnevno čitanje)
- krvni agar: u uslovima sa 5 – 10 % CO₂, 35–37°, 16–48 h inkubacije (svakodnevno čitanje)

23.3 Identifikacija

23.3.1 Kulturelne osobine

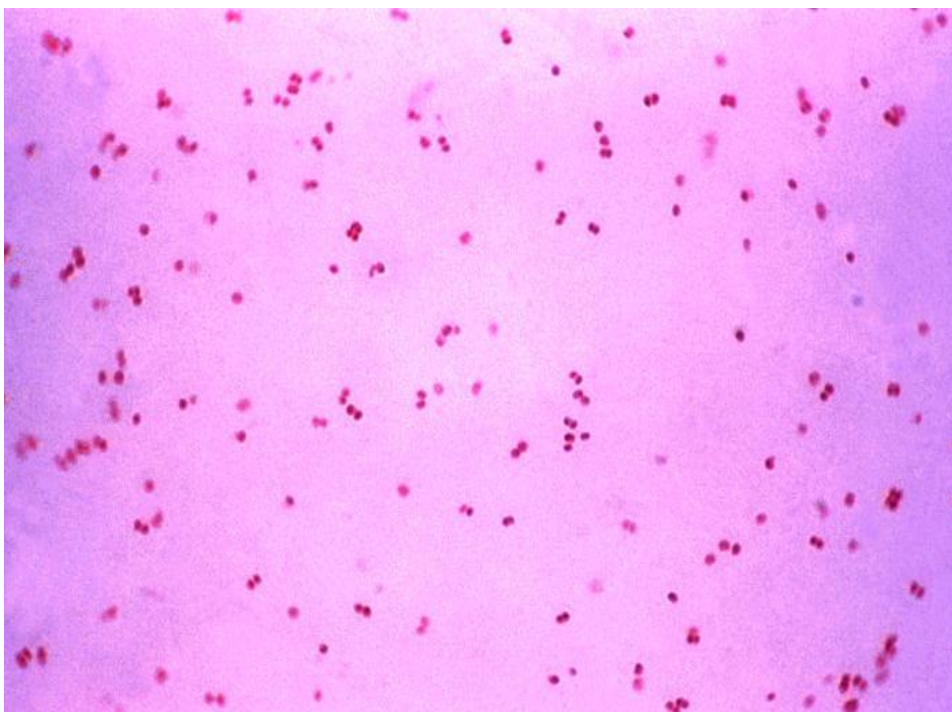
N. gonorrhoeae i *N. meningitidis* formiraju glatke, okrugle, vlažne, sivobraon kolonije sa zelenkastim odsjajem na primarnom izolatu

N. gonorrhoeae ne raste na krvnom agaru.

Moraxella catarrhalis i *Moraxella lacunata* formiraju jako konveksne glatke, okrugle kolonije sa roskastim odsjajem, kompaktne (ezom povučene klizaju po podlozi)

23.3.2 Mikroskopske osobine u preparatu sa kulture

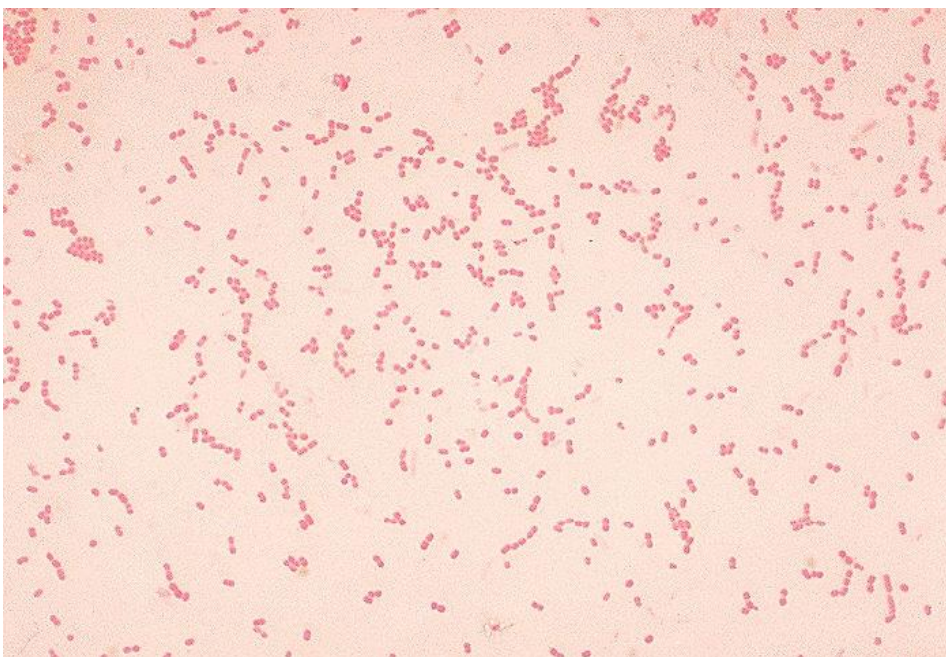
Neisseria species su Gram negativne koke, poređane u parovima, sa paralelnim dužim osovinama (slika br.6)



SLIKA 6. *Neisseria meningitidis*, preparat sa kulture - bojenje po Gram-u

(Izvor: http://biomarker.cdc.go.kr:8080/pathogen/pathogen_vi...)

Moraxella spp. su Gram «-» diplokoke (slika br.7)



SLIKA 7. *Moraxella spp.* – preparat sa kulture bojen po Gram-u
(Izvor: <http://www.buddycom.com/bacteria/gnr/acinetc1259.jpg>)

23.3.3 Ispitivanje fiziološko-biohemijskih osobina

- Oksidaza test pozitivan:
 - *Neisseria*
 - *Kingella species*
 - *Moraxella catarrhalis*
- Oksidaza test negativan:
 - *Gemella species*
 - *Veillonella species*

23.4 Konačna identifikacija

- komercijalni testovi za biohemijsku identifikaciju

24 Identifikacija enterobakterija

24.1 Uvod

Familija *Enterobacteriaceae* čini veliku grupu različitih mikroorganizama. Opisano je 32 roda sa preko 130 vrsta. Glavne osobine članova ove familije:

- Gram negativni bacili, asporogeni, fakultativni anaerobi
- Fermentuju glukozu,
- Redukuju nitrate do nitrita
- Ne proizvode citohrom oksidazu
- Svi članovi su pokretni, osim bakterija iz rodova *Klebsiella* i *Shigella*. *Yersinia spp.* su pokretne na 18-25°C, ali ne i na 37°C.

24.2 Izolacija

- Endo agar/MacConkey agar - diferencijalne podloge za izolaciju gram negativnih bakterija: aerobno, 35-37°C, 16-24h
- MacConkey-sorbitol agar/endo agar sa sorbitolom - za izolaciju *E.coli* 0157:H7: aerobno, 35-37°C, 16-24h
- SS agar – selektivna podloga za *Salmonella* i *Shigella* vrste iz uzoraka stolice: aerobno, 35-37°C, 16-24h
- Selenit F bujon – obogaćena podloga, koristi se za izolaciju *Salmonella* i nekih sojeva *Sigella* iz stolice i drugih uzoraka koji sadrže miješanu floru u velikom broju: aerobno, 35-37°C, 16-24h. Supkultivaciju treba vršiti nakon 8-12h

Izolacija *Yersinia enterocolitica* iz uzoraka stolice:

- SS agar: aerobno, 25°C, 40 - 48h.

24.3 Identifikacija

24.3.1 Kulturelne osobine

Endo agar / *MacConkey* agar - sadrže laktozu kao izvor ugljenih hidrata, organizmi koji fermentuju laktozu stvaraju kolonije roze do crvene boje (laktoza

pozitivne), dok bakterije koje ne fermentuju laktozu stvaraju bezbojne ili transparentne kolonije (laktoza negativne).

MacConkey-sorbitol agar – sorbitol negativne kolonije se pojavljuju kao bezbojne; suspektne su na *E.coli* 0157:H7 i dalje ih treba testirati, većina drugih kliničkih izolata *E.coli* stvaraju pink do crvene kolonije.

SS agar – na ovoj podlozi takođe se mogu razlikovati laktoza pozitivne od laktoza negativnih (sadrži laktozu kao izvor ugljenih hidrata), a može se detektovati produkcija vodonik sulfida -kolonije sa crnim centrom.

- Prozirne, laktoza negativne, kolonije sa crnim centrom su suspektne na *Salmonella* vrste i dalje se ispituju
- Sitne, prozirne, laktoza negativne kolonije suspektne su na *Shigella* i *Yersinia* vrste.

24.3.2 Mikroskopske osobine u preparatu sa kulture

Enterobakterije su gram negativni bacili ili kokobacili, tako da mikroskopske osobine ne mogu da se koriste kao pouzdan kriterijum za identifikaciju.

24.3.3 Ispitivanje biohemijskih osobina

Identifikacija enterobakterija primarno se zasniva na ispitivanju biohemijskih osobina.

U rutinskoj dijagnostici koristi se klasični biohemijski niz za ispitivanje biohemijskih osobina:

- Kliglerov dvostruki ili trostruki šećer
- peptonska voda za dokazivanje indola
- metil red
- *Voges Proskauer*
- Simons citrat
- urea
- manitol

Inkubacija: aerobno, 35-37°C, 16-24h

Prikaz biohemijskih osobina nekih rodova enterobakterija dat je u tabeli br.

8.

Za preciznu biohemijsku identifikaciju, kada je klinički opravdano, koriste se komercijalni biohemijski testovi.

Izolate: *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* species i vrste *Salmonella* koje pripadaju grupama od F-60 i 61-67 potrebno je potvrditi komercijalnim biohemijskim testom. *Salmonella* vrste koje pripadaju grupama od A-E moraju

biti serološki potvrđene, pa iz tog razloga nije neophodna biohemijska potvrda komercijalnim testom.

24.3.4 Ispitivanje antigenske građe

Test aglutinacije na pločici

Za ispitivanje antigene građe koristi se test aglutinacije na pločici.

Izvođenje:

- Od čiste bakterijske kulture, najbolje sa neselektivnog medijuma kao što je krvni agar, može i sa medijuma kao što su Kliglerov dvostruki ili trostruki šećer ili *MacConkey* agar, pripremi se suspenzija bakterija u fiziološkom rastvoru.
- Na pločici se nanese kap seruma, zatim se doda kap suspenzije i laganim miješanjem prati se pojava vidljivih aglutinata.

Salmonella

Salmonella vrste imaju tri glavna antigena:

1. Somatski O antigeni
2. Flagelarni H antigeni
3. Kapsularni Vi antigen - imaju ga inkapsulirane bakterije roda *Salmonella (S.typhi)*

Na osnovu antigenih osobina somatskih O antigena, *Salmonella* vrste se dijele u grupe od A-60 i od 61-67.

98% humanih izolata pripadaju grupama od A do G.

- Prvo se vrši dokazivanje somatskih antigena primjenom polivalentnih, a zatim monovalentnih antiseruma.
- Zatim se dokazuju flagelarni antigeni obje faze.
- Ukoliko dolazi do aglutinacije sa Vi antiserumom, da bi se dokazali drugi antigeni, suspenzija se zagrijava 10 minuta na 100°C, da se inaktivira kapsularni antigen. Nakon hlađenja suspenzija se retestira sa antiserumima od A-E. Ukoliko aglutinira sa antiserumom za grupu D može se izvjestiti kao *S.typhi*.

Minimum serološke potvrde za svaku laboratoriju je identifikacija somatskog antigena monovalentnim serumom, odnosno određivanje grupe za tipove *Salmonella* koje pripadaju grupama od A-E. Vrste koje pripadaju grupama od F-60 i 61-67, treba potvrditi biohemijski komercijalnim testom i izvršiti testiranje polivalentnim antiserumom. Izolati se mogu poslati u referentnu laboratoriju na dalju serotipizaciju.

Obzirom da je *S.enteritidis*, na našim prostorima, najčešći uzročnik infekcija izazvanih bakterijama iz roda *Salmonella*, važno je da svaka laboratorija,

osim seruma za dokazivanje somatskog O antigena, ima antiserume za dokazivanje flagelarnog H antigena za ovu vrstu.

Ukoliko su izolati suspekti na jedan od sledeća tri serotipa *S.typhi*, *S.cholerasuis* ili *S.paratyphi*, zbog kliničkog i epidemiološkog značaja, moraju biti biohemijski identifikovani i serološki potvrđeni.

Shigella

Na osnovu O antigena *Shigella* vrste pripadaju jednoj od četiri serogrupe: A,B,C i D.

S.dysenteriae, *S.flexneri*, *S.boydii* i *S.sonnei* odgovaraju ovim serogrupama. Postoji nekoliko serotipova unutar svake serogrupe, izuzev grupe D koja sadrži samo jedan serotip.

- testom aglutinacije na pločici sa polivalentnim O antiserumima utvrđuje se serogrupa
- Zatim se monovalentnim serumima određuje serotip unutar grupe.

Minimum serološke potvrde je određivanje serogrupe, osim kad je u pitanju *S. dysenteriae* tip 1, kada se mora odrediti serotip.

Prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije prvo se testira sa monovalentnim A1 antiserumom, zatim polivalentnim B antiserumom i na kraju polivalentnim D antiserumom. Serogrupa C, *S.boydii* je vrlo rijetka i prema WHO i CDC nije rentabilno izvoditi rutinsko testiranje.

Ukoliko je aglutinacija neuspješna, suspenzija bakterija se zagrijava da bi se uklonio kapsularni antigen koji može biti prisutan, a zatim se test aglutinacije ponavlja.

Escherichia coli O157:H7

Sorbitol negativne kolonije sa sorbitol-MacConkey agara se subkultivišu, za serotipizaciju sa *E. coli* O157:H7 antiserumom.

Yersinia enterocolitica

Yersinia enterocolitica – podijeljena u šest biogrupa: 1A, 1B, 2, 3, 4 i 5. Vrste biogrupe 1A nisu udružene sa humanim bolestima. Identifikovano je 34 serotipa.

Biohemijski potvrđene izolate treba slati u referentnu laboratoriju za serološku identifikaciju.

25 Identifikacija gram negativnih nefermentujućih bacila

25.1 Uvod

Nefermentujući gram negativni bacili imaju sve veći klinički značaj zbog povećanja broja imunokompromitovanih pacijenata.

Faktori rizika za infekciju ovim mikroorganizmima su: imunosupresija (diabetes mellitus, cancer, transplantacija organa, hormonalni poremećaji), traume, opekotine, vještački implantati.

Ovo je veoma heterogena grupa bacila, jedina zajednička osobina je nereaktivnost na Kligler-ovom šećeru /trostrukom šećeru.

25.2 Izolacija

- Krvni agar - neselektivna podloga: aerobno, 35-37°C, 16-24h
- Endo agar/ MacConkey agar - selektivne podloge: aerobno, 35-37°C, 16-24h

25.3 Identifikacija (shema br.2)

Za identifikaciju nefermentujućih bacila koriste se sljedeće osobine:

- Nereaktivnost na Kligler-ovom šećeru /trostrukom šećeru
- Preparat sa kulture - gram negativni bacili, kokobacili
- Oksidaza reakcija

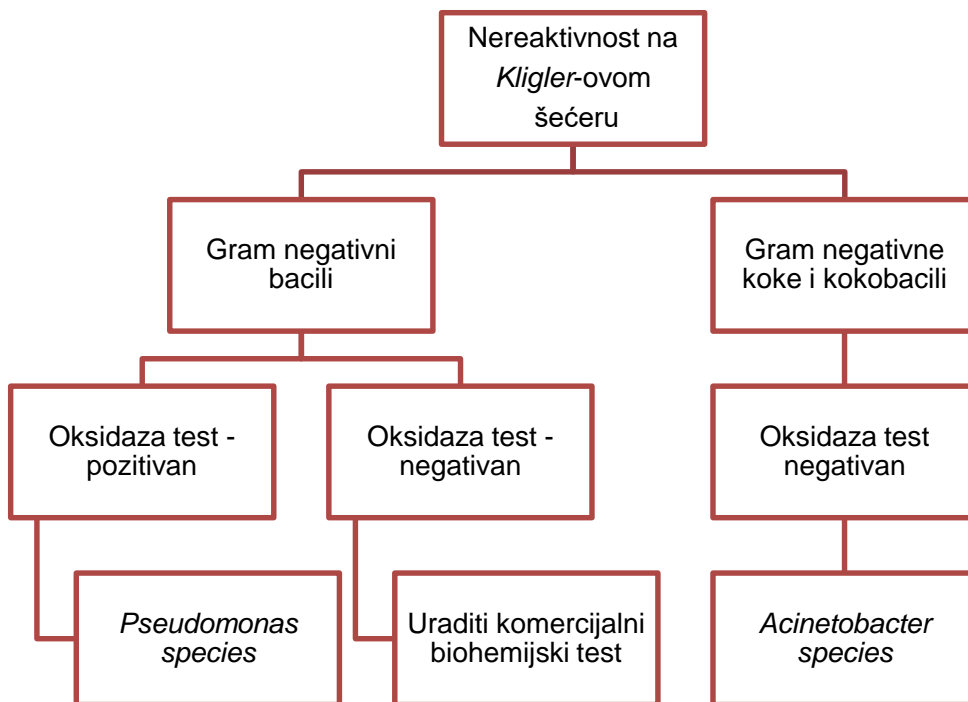
Za preciznu biohemijsku identifikaciju koriste se komercijalni biohemijski testovi.

25.4 Komentar

Definitivna identifikacija nefermentujućih bacila zahtijeva vrijeme i novac, a često i ne odgovara dijagnozi bolesti. Odluka da se identifikuje organizam od vrste, zavisi od materijala iz koga je izolovan:

- a) da li je izolovan iz materijala koji je primarno sterilan,
- b) ili iz primarno nesterilnog materijala, zajedno sa tri ili četiri bakterije.

Prvi slučaj zahtijeva identifikaciju i izradu antibiograma. U drugom slučaju dovoljna je identifikacija na osnovu gore pomenutih osobina.



SHEMA 2. Identifikacija nefermentujućih bakterija

26 Identifikacija *Haemophilus* spp. i HACEK grupe organizama

26.1 Uvod

- HACEK grupa obuhvata vrste:
 - *Haemophilus* spp.
 - *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
 - *Cardiobacterium hominis*
 - *Eikenella corrodens*
 - *Kingella* spp.

26.2 Izolacija

- selektivni čokoladni agar za *Haemophilus*: u uslovima sa 5–10 % CO₂, 35–37°C, 16–48h
- krvni agar sa stafilokoknom crtom: u uslovima sa 5–10 % CO₂, 35–37°C, 16–48h
- *H. ducreyi* selektivni agar - u atmosferi 5 – 10 % CO₂, 33–34°C, 5 dana

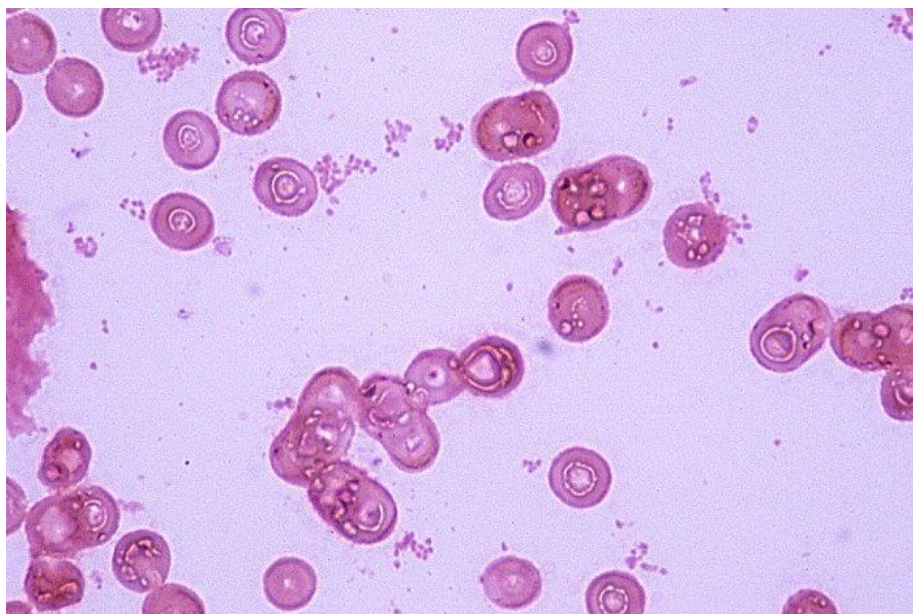
26.3 Identifikacija

26.3.1 *Kulturelne osobine*

Haemophilus species su male, okrugle, konveksne kolonije koje se presijavaju. Rastu poslije 24h inkubacije na čokoladnom agaru. Satelitizam *H. influenzae* se može vidjeti na krvnom agaru oko kolonija *S. aureus*.

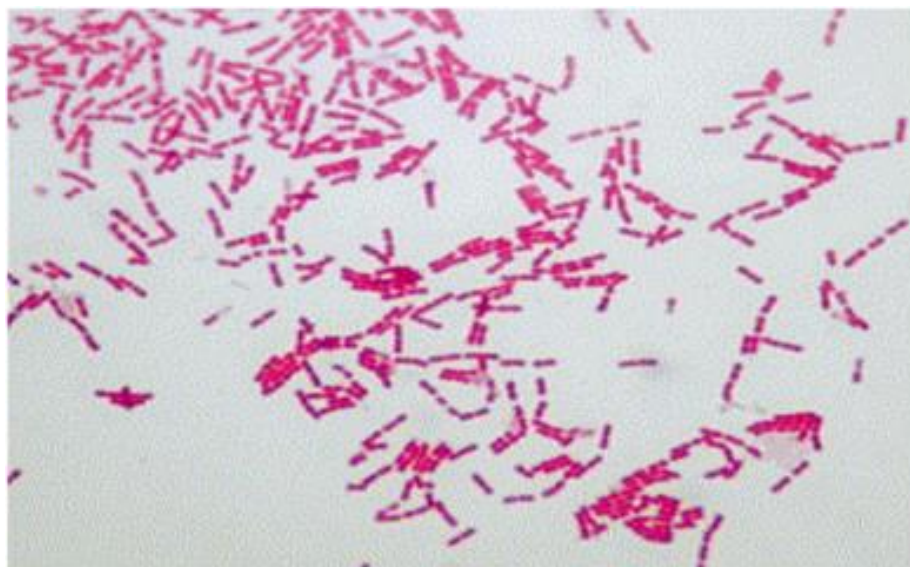
26.3.2 *Mikroskopske osobine u preparatu sa kulture*

Haemophilus species su mali kokobacili ili duži štapići, Gram negativni, različitih dužina, naznačenog pleomorfizma, ponekad sa filamentima (slika br.9).



SLIKA 9. *Haemophilus spp.* u hemokulturi – bojenje po Gram-u
(Izvor: <http://wwwstud.uni-leipzig.de/~mai03kbz/bioinprak/einfuerung.htm>)

Drugi HACEK organizmi su sferične, ovalne ili štapićaste Gram negativne ćelije sa izraženim pleomorfizmom, mogu stvarati filamente (slika br.10).



SLIKA 10. *Kingella kingae* preparat sa kulture-bojenje po Gram-u
(Izvor: www.nature.com/.../v20/n9/fig_tab/6702119f2.html)

26.4 Konačna identifikacija (ako je klinički indikovano)

- Komercijalni testovi za biohemijsko ispitivanje.

26.5 Izvještavanje

- izvjestiti o svim pozitivnim kulturama iz normalno sterilnih uzoraka
- izvjestiti o prethodnoj ili potvrđnoj dijagnozi *Haemophilus species* ili drugih članova HACEK grupe organizama kod:
 - meningitisa ili moždanog apscesa
 - facijalnog celulitisa ili septičnog artritisa
 - epiglotitisa, pneumonije, mastoiditisa ili empiema toraksa
 - septikemije ili endokarditisa
 - pelvičnog apscesa
 - suspektnog šankroida

26.6 Komentar

26.6.1 HACEK grupa organizama

Za razlikovanje HACEK grupe organizama od klinički brojnih, morfološki sličnih, aerobnih ili fakultativno anaerobnih Gram negativnih štapića, uglavnom udruženih sa endokarditisom i infekcijama normalno sterilnih materijala, potreban je sistematski pristup. HACEK grupa mikroorganizama su komensali orofaringealnog/respiratornog trakta. Identifikacija je udružena sa kliničkim detaljima i izolati se dalje identifikuju, ako je klinički indikovano. Izolati klinički značajnih HACEK organizama se šalju referentnoj laboratoriji.

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Ovo je Gram negativan kokobacil ili kratak štapić, 0,3-0,5 x 0,5-1,5 µm, može pokazivati nepravilno bojenje. Povremeno se javе duži oblici (do 6 µm). U preparatu bakterije su pojedinačne, u parovima ili rjeđe u lancima. Mogu proizvoditi manje količine sluzi. Ne zahtijevaju X i V faktor rasta. Poslije 24 h inkubacije, kolonije na krvnom ili čokoladnom agaru su manje od 0,5mm, rastu do 1mm poslije nekoliko dana inkubacije. Mogu biti čvrste, adherentne, zvjezdaste, ponekad neravne površine, urasle, teško se skidaju sa površine agara. Ako proizvodeju ekstatelularnu sluz, kolonije su ljepljive u primoizolatu. Površne kulture su slabo vitalne i mogu uginuti za 5-7 dana. Najbolje rastu u mikroaerofilnim uslovima sa CO₂ i fakultativno su anaerobne. Optimalna temperatura rasta je 37°C. Nepokretan je, ne proizvodeju ureazu.

Cardiobacterium hominis

Genus *Cardiobacterium* sadrži samo jednu vrstu. Čelije su pleomorfne ili pravi štapići (1-3 μm dužine), zaobljenih krajeva, a mogu imati i duge filamente. U preparatu, bakterije su u parovima, kratkim lancima ili rozetama. Gram negativne su, ali djelovi bakterijske čelije mogu biti Gram pozitivni. Rast na krvnom agaru je slab. Ne zahtijevaju V i X faktore rasta. Stvaraju vrlo male kolonije, osim pri inkubaciji u vlažnoj aerobnoj ili anaerobnoj atmosferi sa 5% CO_2 . Poslije dvodnevne inkubacije kolonije su prečnika 1 mm, glatke, opalescentne i mogu prijanjati za agar. *C.hominis* je fakultativni anaerob, ali CO_2 može biti potreban nekim sojevima za primoizolaciju. Optimalna temperatura rasta je 30-37° C. Nepokretan je, oksidaza pozitivan, ureaza i katalaza negativan.

Eikenella corrodens

Genus *Eikenella* sadrži samo jednu vrstu. Čelije su pravi, nerazgranati, nesporogeni, tanki, Gram negativni štapići 0,3-0,4 x 1,5-4 μm dužine. Kolonije su vrlo sitne poslije jednodnevne inkubacije, ili su nevidljive i poslije nekoliko dana. Kolonije imaju vlažan, čist centar. Mogu urastati u podlogu, a žuta obojenost se vidi kod starijih kultura zbog gustine bakterijskih čelija. U istom izolatu se mogu vidjeti različite kolonije. Nehemolitične su, mada se nekad oko kolonije može pojaviti svijetlo zelena zona. Za aerobni rast je obično potreban hemin, a rijetki sojevi ostaju X zavisni poslije subkultivisanja. Optimalna temperatura rasta je 35 – 37° C. Nepokretna je, ali na nekim podlogama može biti pokretna. Sojevi su fakultativno anaerobni, oksidaza pozitivni, katalaza negativni, ureaza negativni. Mogu se zamijeniti za *Bacteroides ureolyticus*, ali je on obligatni anaerob i ureaza pozitivan.

Kingella species

Genus *Kingella* ima dvije vrste: *K.kingae* i *K.denitrificans*. *K.indologenes* je u novom genusu identifikovana kao *Sutonella indologenes*.

Kingella su pravi štapići, 10 μm dužine, zaobljenih ili četvrtastih krajeva. Javljaju se u parovima ili kratkim lancima. Ne stvaraju endospore, Gram negativni su, sa tendencijom opiranja odbojavanju.

Na krvnom agaru se javljaju dva tipa kolonija: šire, neravne i konveksne, glatke.

Ne traži V i X faktor rasta. Rastu aerobno ili fakultativno anaerobno. Optimalna temperatura rasta je 30 – 37°C. Sojevi su nepokretni, oksidaza pozitivni, katalaza negativni, ureaza negativni. Glukozu i druge ugljene hidrate fermentuju uz produkciju kisjeline, ali ne i gasa.

Izgled kolonija HACEK organizama zavisi od vrste i podloge (tabela br.9).

TABELA 9. Izgled kolonija HACEK organizama

HACEK grupa organizama	Karakteristike rasta na krvnom agaru poslije aerobne inkubacije na 35-37°C, 16-48h
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	Ne rastu u vazduhu, ali rastu uz CO ₂ . Male kolonije za 24h, 1mm poslije 48h. Čvrste adherentne, zvjezdaste kolonije neravne površine, mogu urastati u agar. Nehemolitične su.
<i>C.hominis</i>	Neki sojevi ne rastu uz CO ₂ . Kolonije glatke, konveksne, sjajne, 1-2mm za 48h, blago hemolitične.
<i>E.corrodens</i>	Kolonije vrlo male, vlažne, jasan centar okružen zaravnjenjem, mogu urastati; širenje je rijetko, vrlo malo oko kolonije. Nehemolitične. Veličina kolonija 0.5-1mm poslije 48h, zahtijeva 5-10 CO ₂ .
<i>K.kingae</i>	Dva tipa kolonija: šire, neravne i glatke, konveksne. Mala zona β hemolize, sojevi su često sa kapsulom, proizvode sluzave kolonije. Ne zahtijava 5-10 % CO ₂ .
<i>K.denitrifican</i>	Nehemolitične, dva tipa kolonija: šire, neravne i glatke, konveksne.

27 Identifikacija *Bordetella* spp.

27.1 Uzorkovanje

- Kad su simptomi najizraženiji, ako je moguće prije antibiotske terapije
- Uzimanje uzorka nazofaringealnog sekreta kod pacijenata sa velikim kašljem može izazvati napad kašlja i opstrukciju vazdušnih puteva, zato mora biti dostupna oprema za reanimaciju. Osoba koja uzima uzorak mora izbjeći direktan kontakt sa pacijentom dok kašlje.
- Savitljiv dakronski bris se ubacuje kroz nozdrvu po podu nosne duplje do nazofarinksa. Preporučuje se da se bris zadrži na zadnjem nazofarinksu 30-tak sekundi dok se pacijent nakašlje. U praksi, pacijent ovo toleriše samo nekoliko sekundi.
- Nazofaringealni eksudat se uzima sukcionim kateterom, ubačenim kroz nos. Eksudat se sakuplja u sterilnu plastičnu posudu u kojoj se transportuje do laboratorije
- Perinazalni bris - nije dokazano koji način uzimanja uzorka je najbolji.

27.2 Transportovanje

- Uzorak se transportuje i obrađuje što je prije moguće
- Podloga se može inokulisati pored kreveta pacijenta
- Bris se može transportovati u transportnoj podlozi na bazi drvenog uglja

27.3 Izolacija

- Komercijalna podloga za *Bordetella* spp. ili krvni agar sa drvenim ugljem i cefaleksinom - aerobno, 35-37°C, 7 dana (očitanje 4. i 7 dan) – u vlažnoj komori
- (Podloga treba da je deblje razlivena)
- Perinazalni i nazofaringealni bris: inokulisati brisom agar ploču
- Nazofaringealni aspirat: sterilnom ezom odabrati reprezentativni dio uzorka i inokulisati punu ezu na agar ploču.

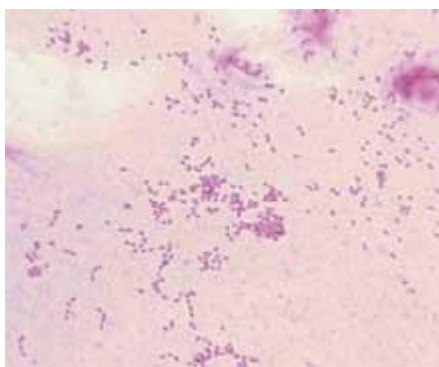
27.4 Identifikacija

27.4.1 Kulturelne osobine

Kolonije sitne (oko 1,5 mm), glatke, sjajne, jako konveksne, srebrenaste (kao kapi žive)

27.4.2 Mikroskopske osobine u preparatu sa kulture

Sitni Gram «-« kokobacili i bacili (Slika br.8)



SLIKA 8. *Bordetella pertussis* – preparat sa kulture bojen po Gram-u
(Izvor: <http://microblog.me.uk/20>)

27.5 Konačna identifikacija (u referentnoj laboratoriji)

- Serološka identifikacija (ili DIF)

27.6 Izvještavanje

- *B.pertussis* nije izolovana
- *B.pertussis* je izolovana

28 Identifikacija *Campylobacter* spp.

28.1 Izolacija

- Selektivna podloga za kampilobakter: mikroaerofilni uslovi, 42°C, 40-48 h.
- Ako se na 1 ploču zasijavaju 4 uzorka stolice, prethodno vrelom ezom napraviti žljebove koji će ploču podijeliti na 4 dijela.

28.2 Identifikacija

28.2.1 *Kulturelne osobine*

Slivene, sjajne kolonije, prozirne ili lagano bjeličasto-sive. Ivice nisu jasne i stapaju se sa podlogom.

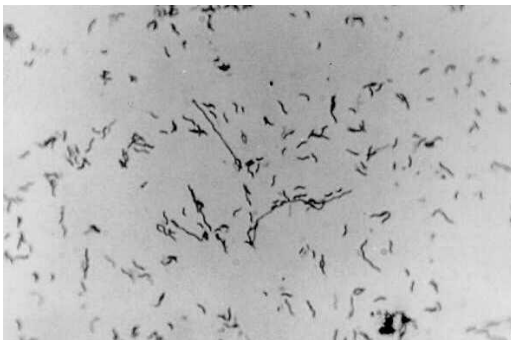
28.3 Konačna identifikacija

28.3.1 *Mikroskopske osobine u preparatu sa kulture*

- Preparat bojen karbol fuksinom
Tipičan mikroskopski izgled -"galeb u letu" ili slovo "S" (slika br.11).
Atipičan mikroskopski izgled: kokoidni oblici.

28.3.2 *Ispitivanje biohemijskih osobina:*

- Katalaza pozitivan; oksidaza pozitivan



SLIKA 11. Tipičan mikroskopski izgled *Campylobacter* spp. -"galeb u letu" ili slovo "S"

Izvor: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch023.htm>

29 Identifikacija *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*

29.1 Uzorkovanje

29.1.1 *Uzorci za ispitivanje*

- bris kože
- bris grla i nosa
- bris nazofarinksa
ako su prisutne membrane – sa ivice membrane

29.1.2 *Način uzorkovanja*

- pošto se radi o kontagioznom i ozbiljnom oboljenju koje zahtijeva hospitalizaciju, uzorci se uzimaju **u bolničkim uslovima**
- bris inflamiranih površina u tonzilofaringealnoj regiji, nazofaringealnoj regiji i nosu-uzeti energičnim rotacionim pokretima
- **Ne skidati pseudomembrane!-opasnost od krvarenja**
- propisno obilježiti uzorak i naglasiti da se radi o sumnji na difteriju-važno zbog posebnih procedura u izolaciji i identifikaciji koje se rutinski ne rade

29.2 Transportovanje

- uzorke transportovati odmah ili deponovati u transportni medijum
- pri transportu – obilježiti prema važećim propisima

29.3 Izolacija

Za obradu uzoraka izolaciju i identifikaciju obavezno koristiti komoru za bezbjedan rad nivoa zaštite II.

Bris kože:

- Krvni agar: u uslovima sa 5 – 10 % CO₂, 35-37°C, 40-48 h
- Cistein telurit krvni agar (Hoyle's teluritni agar): aerobno, 35-37°C, 16-18 h

Bris grla, nosa i nazofarinksa:

- Krvni agar: anaerobno, 35-37°C, 16-24 h

- Cistin telurit krvni agar (Hoyle's teluritni agar): aerobno, 35-37°C, 16-18 h

29.4 Identifikacija

29.4.1 Kulturelne osobine

Corynebacterium diphtheriae

Hoyle's teluritni agar: neprozirne sivo/crne kolonije

var. gravis: mat površine, trošne, suve, kidaju se u manje segmente kad se uzimaju ezom, radijalno su izbrazdane, nepravilnih ivica (na krvnom agaru: nehemolitične)

var. mitis: glatke, sjajne površine, jasno oivičene (na krvnom agaru: mala zona β hemolize)

var. intermedius: sjajne, diskretno prozirne (na krvnom agaru: mala zona β hemolize)

var. belfanti: glatke, sjajne površine (na krvnom agaru: mala zona β hemolize)

Corynebacterium ulcerans

Hoyle's teluritni agar: neprozirne sivo/crne kolonije, veoma suve (na krvnom agaru: mala zona β hemolize)

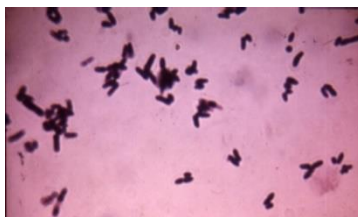
Corynebacterium pseudotuberculosis

Hoyle's teluritni agar: neprozirne sivo/crne kolonije, veoma suve (na krvnom agaru: β hemoliza)

- Mikroskopske osobine u preparatu sa kulture

Bojenje po Gramu: Gram + pleomorfni bacili, bez kapsule (slika br.12)

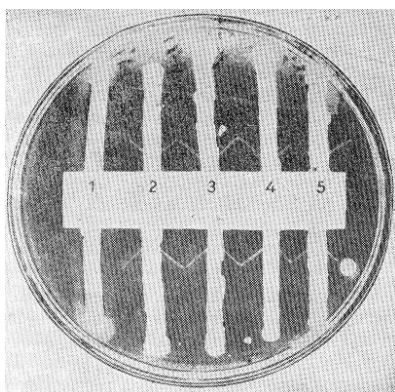
Specijalno bojenje po Neisser-u: u tijelu bacila tamno prebojene granule-**metahromatske ili volutinske granule** (energetski depoi sastavljeni od neorganskih polifosfata)



SLIKA 12. *Corynebacterium spp.* tipičan raspored razbacanih štapića šibice - u preparatu sa kulture bojenom po Gram-u (Izvor: www.emlab.com/s/sampling/env-report-05-2007.html)

- Biohemijsko ispitivanje komercijalnim testovima za ispitivanje biohemijskih osobina
 - Dokazivanje toksigenosti soja
- Modifikovani Elekov test za *in vitro* ispitivanje toksigenosti izolovanog soja (slika br.13)

- 2 ml sterilnog seruma kunića i 1 ml 0.03% kalijum telurita dodati u 10 ml agara za ispitivanje virulencije (KL virulence agar Difco) zagrijanog na 55°C u vodenom kupatilu
- Razliti u petri šolju i rotirati 20 puta da se dobro izmješa
- Prije nego se podloga stvrdne staviti sterilan filter papir dimenzija 1x8 cm natopljen difteričnim antitoksinom (razblažen da sadrži 100 jedinica antitoksina u ml seruma) po dijametru ploče. Papir treba da potone na dno što treba pomoći sterilnom pincetom, ako je potrebno
- Ostaviti podlogu da se stvrdne, pa je sa poluotvorenim poklopcem smjestiti u termostat da ispari višak vlage sa površine
- Inokulisati podlogu unutar 2 h poslije sušenja povlačeći pod pravim uglom u odnosu na filter papir paralelne linije 24-časovne kulture poznatog toksičnog soja, negativnog soja i ispitivanog soja.
- Inkubirati 24-48 h na 35°C
- Tražiti na ploči bijele precipitacione linije koje se pod uglom od 45° pružaju od linija zasijavanja prema filter papiru.
- Rezultat:
 - prisustvo precipitacionih linija = toksigeni soj
 - odsustvo precipitacionih linija = netoksigeni soj



SLIKA 13. Elekov test za *in vitro* ispitivanje toksigenosti izolovanog soja

- Sve sumnjive sojeve ili dokazane patogene sojeve odmah slati u referentnu laboratoriju na kosom krvnom agaru radi ispitivanja toksičnosti (London).

30 Identifikacija anaerobnih bakterija

30.1 Uzorkovanje

- Sadržaj apscesa dobijen punkcijom sterilnom iglom i špricom, poštujući principe aseptičnog rada. Upotreba brisa je lošija alternativa zbog izloženosti bakterija sušenju i toksičnom dejstvu kiseonika.

Napomena: obrada ovih uzoraka ima prioritet u odnosu na druge uzorke

30.2 Transportovanje

- Što je prije moguće, maksimalno do 20 minuta (najduže za pola sata). Ako je brz transport nemoguć, koristiti transportne podloge za anaerobe.

30.3 Izolacija

30.3.1 *Direktan mikroskopski preparat*

- Preparat bojen po Gram-u prikazuje tip i relativan broj mikroorganizama i ćelija domaćina. Takođe može sugerisati upotrebu odgovarajućih podloga i pomoći kliničaru u određivanju terapije prije završene kultivacije.

30.3.2 *Kultivacija*

- Podloga za anaerobe sa 5 µg diskom metronidazola - u anaerobnoj atmosferi, 35 - 37 °C, 48 h
- Sve procedure završiti za što kraće vrijeme.
- Preporučuje se uporedo aerobna kultivacija - krvni agar - aerobno, 35-37°C, 18-24 h

30.4 Identifikacija

- Na osnovu morfoloških osobina bakterijske ćelije (preparat sa kulture bojen po Gram-u), izgleda kolonije, osjetljivosti na prisustvo kiseonika (izostanak rasta na krvnom agaru u aerobnim uslovima), pigmentacije, fluorescencije itd.

- Krajnja identifikacija se vrši ispitivanjem biohemijske aktivnosti upotrebom komercijalnih testova
- Minimalan nivo - nađene «anaerobne bakterije»

30.5 Komentar

Anaerobne infekcije su najčešće miješane infekcije, tj. uz anaerobne bakterije kao uzročnici se javljaju fakultativno anaerobne i aerobne bakterije. Najčešće izolovane anaerobne bakterije iz humanih uzoraka su: *Bacteroides fragilis*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*.

Od značaja su i klinički znaci koji ukazuju na moguću anaerobnu infekciju: prisustvo gnoja neprijatnog mirisa, gas u tkivu (krepitacije), lokacija infekcije u blizini površine sluzokoža, prisustvo sulfatnih granula itd.

31 Ispitivanje osjetljivosti bakterija na antimikrobne supstance disk difuzionim metodom

31.1 Opšte napomene

- Antibiotici se čuvaju prema uputstvu proizvođača (u frižideru, na sobnoj temperaturi, na -20°C, itd).
- Zavisno od vrsta mikroorganizma za koji treba uraditi antibiogram koriste se različiti medijumi (podloge).

Mueller-Hinton agar (MHA) je standardizovana podloga za izvođenje antibiograma.

Za bakterije koje su izbirljive u nutritivnim potrebama dodaje se 5 % defibrinisane ovčije ili konjske krvi (tabela br. 10).

TABELA 10. Podloge za ispitivanje osjetljivosti različitih sojeva bakterija na antimikrobne supstance

MIKROORGANIZMI	MEDIJUM (PODLOGA)
enterobakterije	MHA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MHA
<i>Acinetobacter spp.</i>	MHA
<i>Burkholderia cepacia</i>	MHA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MHA
ostali nefermentujući Gram negativni bacili	MHA
<i>Staphylococci</i>	MHA
<i>Enterococci</i>	MHA
beta hemolitičke streptokoke	MHA + 5% ovčje krvi
viridans streptokoke	MHA + 5% ovčje krvi
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MHA + 5% ovčje krvi
<i>Neisseria meningitidis</i>	MHA + 5% ovčje krvi
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GC agar baza sa 1% definisanog suplementa
<i>H. influenzae, H. parainfluenzae</i>	HTM- <i>Haemophilus</i> Test Medium
anaerobi	Brucela agar sa heminom (5 µg/ml) i vitaminom K ₁ (1 µg/ml)

31.2 Priprema podloge

- Autoklavirati podlogu i rashladiti je na 45- 50 °C (vodeno kupatilo).
- Razliti podlogu u Petri šolje (25 ml podloge u Petri šolju prečnika 90 mm ili oko 50 ml podloge u Petri šolju prečnika 160 mm).
- Debljina podloge mora da bude 4 mm.
- Podloga razlivena uz plamenik pod aseptičnim uslovima i ohlađena na sobnoj temperaturi čuva se u frižideru (2-8 °C) sa poklopcem okrenutim na dolje.
- Prije upotrebe podloga mora stajati bar pola sata na sobnoj temperaturi.
- Ako se na površini podloge nalaze kapi kondenzovane vode, neophodno je prije upotrebe podlogu prosušiti u termostatu tako da površina podloge bude okrenuta na dolje i naslonjena na otvoreni poklopac.
- Pripremljena podloga se može iskoristiti najduže za 7 dana.

31.3 Inokulum

- Priprema se razblaživanjem 18 - 24 časovne čiste bakterijske kulture.
- Ezom se pikira 4-5 kolonija i prenese u 5 ml fiziološkog rastvora.
- Suspenzija se vorteksira, a potom se gustina suspenzije podešava poređenjem sa *McFarland* standardom 0,5 za turbiditet.
- Inokulum se zasijava brisom, ezom ili staklenim štapićem ravnomjerno na površinu podloge.
- Poslije zasijavanja inokuluma poželjno je da podloga stoji 10-15 minuta na sobnoj temperaturi da bi se površina osušila.

31.4 Postavljanje tableta ili diskova

- Izvodi se dispenzerom ili sterilnom pincetom.
- Razmak između diskova je najmanje 3 cm, a rastojanje od ivice suda najmanje 1cm.
- Na ploču prečnika 10 cm nanosi se maksimalno 6 diskova, a na ploču prečnika 12 cm maksimalno 8 diskova.

31.5 Izbor tableta ili diskova

Podijela antibiotika u grupe, prema CLSI- u, od A do U:

- **Grupa A** – antibiotici koji se rutinski primarno ispituju i izvještavaju.

- **Grupa B** – antibiotici koji su klinički značajni i mogu da se primarno ispituju, ali se selektivno izvještavaju, kao npr: kad je soj otporan na lijek iz iste grupe antibiotika grupe A; kod posebnih situacija (npr. cefalosporini 3. generacije za enterobakterije izolovane iz likvora); kod polimikrobne infekcije ili infekcije sa više lokacija; u slučaju da je pacijent alergičan i/ili intolerantan na lijek; kada izostaje terapijski odgovor na lijekove iz grupe A; u svrhu kontrole infekcije.
- **Grupa C** - alternativni antibiotici (za sojeve otporne na više primarnih antibiotika); za terapiju pacijenata alergičnih na lijekove iz grupe A; u svrhu kontrole infekcije i epidemiološku bazu podataka.
- **Grupa U** - antibiotici koji se primarno testiraju samo za izolate iz urina. Ovi lijekovi se rutinski ne testiraju za izolate iz drugih uzoraka izuzev kada se radi o specifičnim urinarnim patogenima koji mogu imati veći broj indikacija (npr. *P. aeruginosa* i ofloxacin).

Izbor antibiotika zavisi od brojnih faktora među kojima su najbitniji izolovani soj, porijeklo izolata (ambulantni/bolnički, djeca/odrasli) i vrsta materijala iz kojeg je izvršena izolacija. Za sve uzorke, izuzev urina, ispitivanje rezistencije raditi za antibiotike iz grupa A, B i C. Izvještavati u skladu sa CLSI preporukama.

Bakterija izolovane iz likvora ne treba testirati na sledeće lijekove, jer oni nisu efikasni u terapiji infekcija CNS- a:

- 1. i 2. generaciju cefalosporina (izuzev cefuroksima za parenteralnu primenu),
- cefamicine,
- klindamicin,
- makrolide,
- tetracikline i
- fluorohinolone.

Fluorohinoloni su kontraindikovani za djecu mlađu od 12 godina, pa stoga ih rutinski ne prijavljivati!

31.5.1 *Staphylococcus spp.*

Izbor antibiotika

- Grupa A: penicilin, oksacilin/meticilin (cefoksitinom), klindamicin, eritromicin/azitromicin, trimetoprim/sulfametoksazol
Grupa B: linezolid, vankomicin, tetraciklin, rifampicin

Grupa C: gentamicin, ciprofloksacin/ofloksacin/levofloksacin,
hloramfenikol

Grupa U: norfloksacin, nitrofurantoin

Osjetljivost stafilokoka na beta-laktamske antibiotike se testira penicilinom i cefoksitinom.

Penicilin tableta – za testiranje osjetljivosti na sve beta-laktamaza labilne peniciline: ampicilin, amoksicilin, azlocilin, mezlocilin, karbencilin, piperacilin i tikarcilin.

Cefoksitin tableta – za testiranje osjetljivosti na beta-laktamaza stabilne peniciline (kloksacilin, dikloksacilin, flukloksacilin, meticilin, nafcilin).

Vankomicin testirati isključivo E testom! MIK vrijednosti za vankomicin kod *S. aureus*-a i koagulaza-negativnog stafilokoka se razlikuju. Svaki soj *S. aureus*-a čiji je MIK $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ i koagulaza-negativnog stafilokoka čiji je MIK $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ poslati u referentnu laboratoriju.

Izolate *Staphylococcus saprophyticus*-a iz urina rutinski ne testirati, jer pokazuju osjetljivost na antimikrobne agense koji se koriste u terapiji nekomplikovanih urinarnih infekcija (npr. nitrofurantoin, trimetoprim/sulfametoksazol, fluorohinoloni).

Rezistencija na ciprofloksacin se stiče brzo u toku terapije, pa je obavezno ponovno testiranje.

Tumačenje rezultata

Za *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus lugdunensis*:

- ako je zona inhibicije rasta oko diska cefoksitina $\leq 21\text{mm}$ izvještava se kao oksacilin (meticilin) otporan (R);
- ako je zona inhibicije rasta oko diska cefoksitina $> 22\text{mm}$ izvještava se kao oksacilin (meticilin) osjetljiv (S).

Za ostale koagulaza negativne stafilokoke:

- ako je zona inhibicije rasta oko diska cefoksitina $\leq 24\text{mm}$ izvještava se kao oksacilin (meticilin) otporan (R);
- ako je zona inhibicije rasta oko diska cefoksitina $> 25\text{mm}$ izvještava se kao oksacilin (meticilin) osjetljiv (S).

Oksacilin S / penicilin S – stafilokok je istovremeno **osjetljiv** i na druge peniciline, kombinacije beta-laktam / beta-laktamaza inhibitora (amoksisilin / klavulanska kiselina, ampicilin / sulbaktam, piperacilin / tazobaktam, tikarcilin / klavulanska kiselina), cefalosporine (cefahlor, cefdinir, cefpodoksim, cefprozil, cefuroksim, lorakarbef, cefamandol, cefazolin, cefepim, cefmetazol, cefonicid, cefoperazon, cefotaksim, cefotetan, ceftizoksim, ceftriakson, cefuroksim, cefalotin, ceftarolin, moksalaktam) i karbapeneme (doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem).

Oksacilin S / penicilin R – stafilokok je **rezistentan** na beta-laktamaza labilne peniciline, a **osjetljiv** na beta-laktamaza stabilne peniciline, kombinacije beta-laktam/beta-laktamaza inhibitor i karbapeneme.

Oksacilin R – stafilokok je **rezistentan** na sve beta-laktamske antibiotike, uključujući i karbapeneme, osim na cefalosporine koji djeluju na meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (**ceftarolin**).

Klindamicin izvještavati otpornim u slučaju inducibilne klindamicin rezistencije (D zona detektovana disk difuzionim metodom).

Osjetljivost na eritromocin, klindamicin, hloramfenikol i minociklin se rutinski ne izvještava za izolate iz urina.

Sojevi osjetljivi na tetraciklin se mogu izvjestiti osjetljivim i na minociklin i doksiciklin. Međutim, neki sojevi umjereno osjetljivi ili otporni na tetraciklin mogu biti osjetljivi na minociklin, doksiciklin ili oba.

Izvještavanje

Dozni režim je potreban za postizanje terapijske koncentracije lijeka u plazmi i odnose se na pacijente sa normalnom funkcijom jetre i bubrega:

- ceftarolin: 600 mg/12 h u terapiji MRSA.

Za sve osjetljive izolate stafilokoka, aminoglikozide koristiti samo u kombinaciji sa drugim osjetljivim lijekovima.

Rifampicin se ne može koristiti sam u terapiji.

31.5.2 *Streptococcus spp* - grupa beta-hemolitičkih streptokoka (grupa BHS)

Izbor antibiotika

- Grupa A: ampicilin/penicilin, eritromicin, klindamicin
- Grupa B: cefepim/cefotaksim/ceftriakson, vankomicin
- Grupa C: ofloksacin, levofloksacin, hloramfenikol, linezolid, kvinupristin-dalfopristin

Izbor antibiotika se odnosi na grupu BHS koje formiraju velike kolonije piogenih sojeva streptokoka sa antigenima grupe A (*S. pyogenes*), C ili G i sojevima sa antigenom grupe B (*S. agalactiae*). Sojevi BHS sa antigenima grupe A, C, F ili G koji formiraju male kolonije (*S. anginosus* grupa, ranije nazivana *S. milleri*) se smatraju delom viridans grupe i za njih treba koristiti interpretativne kriterijume za viridans grupu.

Streptococcus pyogenes se NE mora testirati na penicilin, jer u uslovima *in vitro* još nisu otkriveni otporni sojevi.

Ukoliko se uoči otpornost na ampicilin/penicilin bilo kog izolata BHS, identifikaciju i testiranje treba ponoviti i u slučaju pojave otpornosti, soj poslati referentnoj ustanovi.

Samo *Streptococcus pyogenes* testirati na kvinupristin-dalfopristin.

Tumačenje nalaza

BHS (grupe A, B, C i G) koji je osjetljiv na penicilin može se smatrati osjetljivim i na: ampicilin, amoksicilin, amoksicilin/klavulansku kiselinu, ampicilin/sulbaktam, cefazolin, cefepim, ceftarolin, cefradin, cefalotin, cefotaksim, ceftriakson, imipenem, ertapenem i meropenem. Pored toga, *S. pyogenes* može se smatrati osjetljivim i na: cefahlor, cefdinir, cefprozil, ceftibuten, cefuroksim, cefpodoksim i cefapirin.

Rezultat osjetljivosti na eritromicin odnosi se i na: azitromicin, klaritromicin i diritromicin.

Klindamicin izvještavati otpornim u slučaju inducibilne klindamicin rezistencije (D zona detektovana disk- difuzionom metodom).

Osjetljivost na eritromicin, klindamicin i hloramfenikol se rutinski ne izvještava za izolate iz urinarnog trakta.

Izveštavanje

Preporuke za profilaksu trudnica sa *S. agalactiae* su ampicilin ili penicilin. Cefazolin se preporučuje kod trudnica sa niskim rizikom od anafilakse, a klindamicin kod trudnica sa visokim rizikom od anafilakse (prethodno ispitati osjetljivost).

31.5.3 *Streptococcus spp* - viridans grupa (*S. anginosus* grupa i alfa-hemolitičke streptokoke)

Izbor antibiotika

Grupa A: ampicilin/penicilin

Grupa B: cefepim, cefotaksim, ceftriakson, vankomicin

Grupa C: hloramfenicol, eritromicin, klindamicin, linezolid

U viridans grupu se ubrajaju slijedeće streptokoke: *mutans*, *salivarius*, *bovis*, *anginosus* i mitis grupa. Bakterije *anginosus* grupe formiraju male kolonije sa β hemolizom i antigenima grupa A, C, F ili G.

Ampicilin i penicilin testirati isključivo E testom za izolate iz primarno sterilnih regija!

Tumačenje nalaza

Rezultat osjetljivosti na eritromicin odnosi se i na: azitromicin, klaritromicin i diritromicin.

Osjetljivost na eritromicin, klindamicin i hloramfenikol se rutinski ne izvještava za izolate iz urina.

Izveštavanje

Ukoliko soj pokazuje umjerenu osjetljivost na ampicilin i penicilin, tada ih koristiti u kombinovanoj terapiji sa aminoglikozidima kako bi se postigao baktericidni efekat.

31.5.4 *Streptococcus pneumoniae*

Izbor antibiotika

- Grupa A: penicilin (oksacilinom), eritromicin, trimetoprim/sulfametoksazol
- Grupa B: cefepim, cefotaksim, ceftriakson, klindamicin, levofloksacin, ofloksacin, meropenem, tetraciklin, vankomicin
- Grupa C: amoksicilin, amoksicilin/klavulanska kiselina, cefuroksim, hloramfenikol, ertapenem, imipenem, linezolid, rifampicin

Osjetljivost na penicilin se radi isključivo oksacilinom!

Tumačenje nalaza

Za sojeve *S. pneumoniae* izolovane **iz likvora**, osjetljivost na penicilin, ceftriakson, cefotaksim i meropenem treba utvrditi određivanjem MIK-ova bez prethodnog testiranja sa oksacilinom. Za ove sojeve treba istovremeno ispitati i osjetljivost na vankomicin disk-difuzionim metodom ili određivanjem MIK-a.

Za sojeve *S. pneumoniae* koji **nijesu izolovani iz likvora**, koristi se oksacilin skrining test. Ako je *S. pneumoniae* osjetljiv na oksacilin (oksacilin zona ≥ 20 mm) znači da je osjetljiv i na peniciline (oralne i parenteralne). Sojevi *S. pneumoniae* koji su osjetljivi na penicilin smatraju se osjetljivim i na: ampicilin, amoksicilin, ampicilin/sulbaktam, amoksicilin/klavulansku kiselinu, cefahlor, cefdinir, cefditoren, cefepim, cefotaxim, cefpodoksim, cefprozil, ceftarolin, ceftizoksim, ceftriakson, cefuroksim, doripenem, ertapenem, lorakarbef, imipenem i meropenem, pa se osjetljivost na ove antibiotike ne ispituje, jer pouzdani disk-difuzioni testovi za sada ne postoje. Ako je soj otporan na oksacilin, ne smije se proglasiti otpornim ili umjereno osjetljivim na penicilin samo na osnovu oksacilin testa. Obavezno se radi MIK za penicilin dilucionom metodom ili E - testom.

Amoksicilin, ampicilin, cefepim, cefotaksim, ceftriakson, cefuroksim, ertapenem, imipenem i meropenem se mogu koristiti u terapiji infekcija izazvanih pneumokokom, međutim, pouzdani disk-difuzioni testovi osjetljivosti još uvijek ne postoje. Njihova *in vitro* aktivnost se određuje pomoću MIK vrijednosti.

MIK vrijednosti su različite za oralne i parenteralne (meningitis i ne - meningitis) peniciline i cefalosporine!

Ako se ne može uraditi MIK, treba u komentaru antibiograma naznačiti da soj ima smanjenu osjetljivost na penicilin.

Ako je soj osjetljiv na eritromicin može se smatrati osjetljivim i na: azitromicin, klaritromicin i diritromicin.

Klindamicin izvještavati otpornim u slučaju inducibilne klindamicin rezistencije (D zona detektovana disk difuzionim metodom).

Osjetljivost na eritromicin, klindamicin i hloramfenikol se rutinski ne izvještava za izolate iz urinarnog trakta.

Ako je soj osjetljiv na tetraciklin može se smatrati osjetljivim i na: doksiciklin i minociklin.

Izvještavanje

Osjetljivost na peniciline i cefalosporine se izvještava u zavisnosti da li se radi o meningitisu ili nemeningitisu. Za izolate **iz likvora** dati samo interpretaciju parenteralne terapije za meningitis prema MIK vrijednostima za meningitis, a za sve ostale izolate (izuzev iz likvora) izvjestiti terapiju i za meningitis i za nemeningitis prema MIK vrijednostima za nemeningitis (oralnu i parenteralnu).

Dozni režimi su potrebni za postizanje terapijske koncentracije lijeka u plazmi i odnose se na pacijente sa normalnom funkcijom jetre i bubrega:

penicilin parenteralno (nemeningitis):

- kada je $MIK \leq 2 \mu\text{g/ml}$ najmanje 2 miliona I.J./4 h za odrasle ili 12 miliona I.J./dan
- kada je $2 < MIK < 8 \mu\text{g/ml}$ doza je 18 - 24 miliona I.J./dan

penicilin parenreralno (meningitis):

- maksimalne doze intraveske primene penicilina (npr. najmanje 3 miliona I.J./4 h za odrasle)

Rifampicin se ne može koristiti sam u terapiji.

31.5.5 *Enterococcus spp.*

Izbor antibiotika

- Grupa A: ampicilin, penicilin
- Grupa B: linezolid, vankomicin
- Grupa C: gentamicin (120 μg)

Grupa U: ciprofloksacin, levofloksacin, norfloksacin, nitrofurantoin, tetraciklin

Za umjereno osjetljive sojeve na aminoglikozide (zona inhibicije rasta od 7 do 9 mm) treba uraditi agar dilucioni metod. Osjetljivi su izolati čija je zona ≥ 10 mm (u korelaciji je sa MIK-om ≤ 500 $\mu\text{g/ml}$), a otporni su izolati čija je zona ≤ 6 mm (u korelaciji je sa MIK-om > 500 $\mu\text{g/ml}$).

Vankomicin rezistentne sojeve *E. faecium* treba testirati na kvinupristin/dalfopristin.

U testovima *in vitro* sojevi enterokoka mogu biti osjetljivi na cefalosporine, aminoglikozide (uobičajena doza), klindamicin i kotrimoksazol, ali ovi antibiotici su klinički neefikasni, pa ih ne treba uvrštavati u antibiogram.

Tumačenje nalaza

Rezistencija enterokoka na ampicilin i penicilin koja je uslovljena produkcijom beta-laktamaza ne može se pouzdano utvrditi rutinskim disk-difuzionim ili dilucionim metodom. Preporučuje se **nitrocefinski test**, a obavezno za izolate iz krvi i likvora!

Ako je nitrocefinski test pozitivan – izolat je otporan na penicilin, kao i na amino i ureidopeniciline.

Sojevi enterokoka koji ne proizvode beta-laktamaze i koji su osjetljivi na ampicilin, mogu se smatrati osjetljivim i na amoksicilin, kao i na amoksicilin/klavulansku kiselinu, ampicilin/sulbaktam, piperacilin i piperacilin/tazobaktam, ali ne znači da su osjetljivi i na penicilin. Osjetljivost na ampicilin se može koristiti za predviđanje osjetljivosti na imipenem ukoliko je potvrđeno da se radi o *E. faecalis*-u.

Sojevi enterokoka koji ne proizvode beta-laktamaze i koji su osjetljivi na penicilin, mogu se smatrati osjetljivim i na ampicilin, amoksicilin, ampicilin/sulbaktam, amoksicilin/klavulansku kiselinu, piperacilin i piperacilin/tazobaktam.

Kad se testira osjetljivost enterokoka na vankomicin, inkubacija mora biti puna 24 sata, a očitavanje pod kosim uglom. Prisustvo bilo kakvog rasta ili zamagljenja unutar zone inhibicije rasta ukazuje na otpornost!

Za sojeve sa umjerenom otpornošću na vankomicin treba uraditi MIK. Ukoliko je MIK od 8 do 16 $\mu\text{g/ml}$ treba uraditi **vankomicin test**:

Podloga: BHI (moždano-srčani infuzioni) agar sa 6 µg/ml vankomicina
Inokulum: zasijava se 10 µl suspenzije gustine 0,5 Mc Farland
Inkubacija: 35±2 °C, 24 h
Rezultat: Pojava više od jedne kolonije ukazuje na otpornost na vankomicin.

Sojevi osjetljivi na tetraciklin se mogu izvjestiti osjetljivim i na minociklin i doksiciklin. Međutim, neki sojevi umjereno osjetljivi ili otporni na tetraciklin mogu biti osjetljivi na minociklin, doksiciklin ili oba.

Izvještavanje

Ukoliko je soj osjetljiv na beta-laktamske antibiotike (ampicilin, penicilin, vankomicin) i na visoke doze aminoglikozida (gentamicin i streptomycin), izvještavati kao komentar kliničaru – **Aminoglikozidi se mogu koristiti u terapiji samo u visokim dozama i isključivo u kombinaciji sa beta-laktamskim antibioticima.**

31.5.6 Enterobakterije

Izbor antibiotika

ENTEROBACTERIACEAE

Grupa A: ampicilin, cefazolin, gentamicin

Grupa B: amikacin, amoksicilin/klavulanska kiselina, piperacilin/tazobaktam, cefuroksim (parenteralno), cefepim, cefoksitin, cefotaksim/ceftriakson, ciprofloksacin, ertapenem, imipenem, meropenem, piperacilin, trimetoprim/sulfametoksazol

Grupa C: aztreonam, ceftazidim, hloramfenikol, tetraciklin

Grupa U: cefazolin/cefalotin*, cefahlor, cefaleksin, cefuroksim (oralno), norfloksacin, nitrofurantoin

* **skrining test za oralne cefalopsporine kod nekomplikovane urinarne infekcije**

Tumačenje nalaza

Ako je soj osjetljiv na ampicilin onda je osjetljiv i na amoksicilin.

Kada se testiraju izolati enterobakterija iz likvora, treba soj ispitati na cefotaksim ili ceftriakson.

Salmonella spp. i *Shigella spp.* mogu pokazivati *in vitro* dobru osjetljivost prema cefalosporinima 1. i 2. generacije i cefamicinima, ali bez kliničke efikasnosti, pa ih ne treba izvještavati kao osjetljive na ove antibiotike.

Kada su u pitanju izolati *Salmonella spp.* i *Shigella spp.* iz fecesa, osjetljivost se ispituje samo za ampicilin, fluorohinolone, trimetoprim/sulfametoksazol i nalidiksnu kiselinu. Kod ekstraintestinalnih izolata salmonela treba ispitivati i izvještavati i cefalosporine treće generacije. Pri tome je testiranje indikovano samo za tifoidne salmonelle (*Salmonella Typhi* i *Salmonella Paratyphi A, B i C*) iz intestinalnih ili ekstraintestinalnih izvora. **Testiranje osjetljivosti netifoidnih izolata salmonela iz fecesa treba raditi, ali izvještavati samo osjetljivost bolničkih sojeva!**

Enterobacter spp., *Citrobacter spp.* i *Serratia spp.* mogu razviti rezistenciju u toku terapije cefalosporinima 3. generacije zbog derepresije AmpC β -laktamaze. Osjetljivi izolati mogu postati rezistentni u toku 3-4 dana od početka terapije, pa je opravdano vršiti ponovno ispitivanje osjetljivosti soja izolovanog sa istog mjesta infekcije!

Sojevi osjetljivi na tetraciklin se mogu izvjestiti osjetljivim i na minociklin i doksiciklin. Međutim, neki sojevi umjereno osjetljivi ili otporni na tetraciklin mogu biti osjetljivi na minociklin, doksiciklin ili oba.

Kod nekomplikovanih urinarnih infekcija uzorkovanih sojevima *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. mirabilis*- a, osjetljivost na cefazolin/cefalotin važi i za oralne cefalosporine (cefaleksin, cefadroksil, cefpodoksim i lorakarbef). Ipak, u slučaju otpornosti na cefazolin, izolati mogu biti osjetljivi na cefpodoksim i cefuroksim (oralno), pa treba ispitati njihovu osjetljivost na ove lijekove.

Osjetljivost na hloramfenikol ne izvještavati za izolate iz urina.

Izvještavanje

Dozni režimi su potrebni za postizanje terapijske koncentracije lijeka u plazmi i odnose se na pacijente sa normalnom funkcijom jetre i bubrega:

- cefazolin: 2 g / 8 h

- cefepim: 1 g / 12 h
- cefotaksim, ceftazidim, aztreonam: 1 g / 8 h
- ceftriakson, ertapenem: 1 g / 24 h
- cefoksitin: najmanje 8 g / 24 h ili 2 g / 6 h;
- cefuroksim (parenteralno): 1,5 g / 8 h;
- imipenem: 500 mg / 6 h ili 1 g / 8 h;
- meropenem: 1 g / 8 h.

Detekcija ESBL – posebni protokol!

31.5.7 *Haemophilus influenzae* i *Haemophilus parainfluenzae*

Izbor antibiotika

Grupa A: ampicilin, trimetoprim/sulfametoksazol

Grupa B: cefuroksim (parenteralno), cefotaksim /ceftriakson /ceftazidim, hloramfenikol, meropenem

Grupa C: azitromicin, aztreonam, amoksicilin/klavulanska kiselina, cefahlor, cefiksim, cefuroksim (oralno), ciprofloksacin/ofloksacin/levofloksacin, ertapenem/imipenem, rifampicin, tetraciklin

Ne stavljati više od 4 diska na jednu ploču!

Za sojeve *Haemophilus influenzae* **iz likvora**, testirati i izvještavati: ampicilin, jedan cefalosporin 3. generacije, hloramfenikol i meropenem.

Za empirijsku terapiju infekcija respiratornog trakta izazvanih *Haemophilus spp.* mogu se koristiti oralni lijekovi: amoksicilin/klavulanska kiselina, azitromicin, klaritromicin, cefahlor, cefprozil, lorakarbef, cefdinir, cefiksim, cefpodoksim, cefuroksim i telitromicin– ne moraju se rutinski testirati.

Tumačenje nalaza

Ako je soj osjetljiv na ampicilin onda je osjetljiv i na amoksicilin.

Većina sojeva *Haemophilus influenzae* otpornih na ampicilin i amoksicilin su produktori beta- laktamaza. Nitrocefinski test može odrediti osjetljivost na ampicilin i amoksicilin.

Tetraciklin je predstavnik svih tetraciklina, pa se rezultati osjetljivosti odnose i na doksiciklin i minociklin.

Osjetljivost na hloramfenikol ne izvještavati za izolate iz urina.

Izveštavanje

Rifampicin se može koristiti samo za profilaksu, ali ne i u terapiji infekcija uzrokovanih invazivnim izolatima *Haemophilus influenzae*.

31.5.8 *Neisseria gonorrhoeae*

Izbor antibiotika

Grupa A: ceftriakson, ciprofloksacin, tetraciklin

Osjetljivost *N. gonorrhoeae* ispituje se samo kad za to postoje kliničke indikacije (alergija na penicilin, neodgovarajući klinički odgovor).

Tumačenje rezultata

Kod svih sojeva *N. gonorrhoeae* **prvo** treba uraditi **nitrocefinski test** .

Ako je nitrocefinski test **pozitivan** – soj je **otporan** na penicilin, ampicilin i amoksicilin.

Ukoliko je zona inhibicije rasta ≤ 19 mm oko diska tetraciklina, verovatno se radi o plazmidima posredovanoj otpornosti na tetracikline i treba odrediti osjetljivost MIK dilucionom metodom.

Tetraciklin je predstavnik svih tetraciklina, pa se rezultati osjetljivosti odnose i na doksiciklin i minociklin.

31.5.9 *Neisseria meningitidis*

Testiranje osjetljivosti izolata se može izvoditi samo ukoliko laboratorija raspolaže BSC– om (Biological Safety Cabinet) uz primenu procedura i opreme BSL– 3 nivoa zaštite. U suprotnom, sojeve poslati u referentnu laboratoriju.

31.5.10 *Pseudomonas aeruginosa*

Izbor antibiotika

grupa A: ceftazidim, gentamicin, piperacilin

- grupa B: amikacin, aztreonam, cefepim, ciprofloksacin, levofloksacin, imipenem, meropenem, piperacilin/tazobaktam, tikarcilin
grupa U: ofloksacin, norfloksacin

Pseudomonas aeruginosa može brzo da razvije rezistenciju na sve antibiotike (unutar 3- 4 dana od započete terapije), pa je zbog toga preporučljivo retestirati isti soj.

Osjetljivost izolata *Pseudomonas aeruginosa* kod pacijenata sa cističnom fibrozom može se pouzdano utvrditi disk-difuzionom metodom, ali se preporučuje izvještavanje poslije produžene inkubacije (do 24 sata).

Tumačenje rezultata

Metode za skrining i potvrđne ESBL testove još nijesu određene!

Izveštavanje

Obavezan komentar ukoliko je soj osjetljiv na penicilinske preparate i betalaktam-betalaktamske inhibitore – **Penicilinski preparat i betalaktam-betalaktamski inhibitor ne koristiti kao monoterapiju, već u visokim dozama i u kombinaciji sa fluorohinolonom ili aminoglikozidom.**

Dozni režimi su potrebni za postizanje terapijske koncentracije lijeka u plazmi i odnose se na pacijente sa normalnom funkcijom jetre i bubrega:

- piperacilin, piperacilin/tazobaktam i tikarcilin: najmanje 3 g / 6 h;
- ceftazidim i aztreonam: 1g / 6 h ili 2 g / 8 h;
- cefepim: 1 g / 8 h ili 2 g / 12 h;
- imipenem: 1 g / 8 h ili 500 mg / 6 h;
- meropenem: 1 g / 8 h.

31.5.11 *Acinetobacter spp.*

Izbor antibiotika

- grupa A: ceftazidim, ciprofloksacin, levofloksacin, imipenem, meropenem, gentamicin

grupa B: amikacin, piperacilin/tazobaktam, cefepim, cefotaksim, ceftriakson, tetraciklin, piperacilin, trimetoprim/sulfametoksazol

Tumačenje rezultata

Za izolate iz likvora ne izvještavati: gentamicin, cefepim, ciprofloksacin!

Sojevi osjetljivi na tetraciklin se mogu izvjestiti osjetljivim i na minociklin i doksiciklin. Međutim, neki sojevi umjereno osjetljivi ili otporni na tetraciklin mogu biti osjetljivi na minociklin, doksiciklin ili oba.

Izvještavanje

Dozni režimi su potrebni za postizanje terapijske koncentracije lijeka u plazmi i odnose se na pacijente sa normalnom funkcijom jetre i bubrega:

- imipenem: 500 mg / 6 h;
- meropenem: 1 g / 8 h ili 500 mg / 6 h.

31.5.12 *Burkholderia cepacia*

Izbor antibiotika

grupa A: trimetoprim/sulfametoksazol
grupa B: ceftazidim, meropenem

Pri očitavanju zone inhibicije zanemariti sitne kolonije koje se vide samo lupom pri ivicama zone inhibiranog rasta i izmeriti prečnik zone jasne inhibicije rasta.

31.5.13 *Stenotrophomonas maltophilia*

Izbor antibiotika

grupa A: trimetoprim/sulfametoksazol
grupa B: levofloksacin

Pri očitavanju zone inhibicije zanemariti sitne kolonije koje se vide samo lupom pri ivicama zone inhibiranog rasta i izmeriti prečnik zone jasne inhibicije rasta.

31.5.14 Ostali nefermentujući Gram negativni bacili

Izbor antibiotika

- grupa A: ceftazidim, gentamicin, piperacilin
- grupa B: amikacin, aztreonam, cefepim, ciprofloksacin, levofloksacin, imipenem, meropenem, piperacilin/tazobaktam, trimetoprim/sulfametoksazol
- grupa C: cefotaksim, ceftriakson, hloramfenikol
- grupa U: ofloksacin, norfloksacin, tetraciklin

Disk– difuzioni metod nije preporučljiv, jer zbog nedostatka relevantnih kliničkih podataka nije sistematski proučen. Zato je neophodno odrediti osjetljivost za sve navedene antibiotike na osnovu MIK vrijednosti.

31.5.15 Anaerobne bakterije

Izbor antibiotika

- grupa A: ampicilin, penicilin, amoksicilin/klavulanska kiselina, piperacilin/tazobaktam, klindamicin, ertapenem, imipenem, meropenem, metronidazol
- grupa C: cefoksitin, ceftriakson, piperacilin, tikarcilin, tetraciklin, hloramfenikol

Disk– difuzioni metod nije preporučljiv, jer zbog nedostatka relevantnih kliničkih podataka nije sistematski proučen. Zato je neophodno odrediti osjetljivost za sve navedene antibiotike na osnovu MIK vrijednosti.

Ampicilin i penicilin se preporučuju za primarno testiranje (A grupa) kod Gram pozitivnih anaeroba, jer većina ovih bakterija ne proizvodi beta– laktamaze, ali ne i kod Gram negativnih anaeroba koji su uglavnom beta– laktamaza produktori i ovi lijekovi se testiraju u okviru C grupe. Nitrocefinskim testom svi pozitivni sojevi se mogu izvjestiti kao otporni na penicilin, ampicilin i amoksicilin.

Svi članovi *Bacteroides fragilis* grupe su otporni na peniciline.

Osjetljivost na hloramfenikol ispitivati samo kod Gram negativnih anaeroba.

Mnoge Gram– pozitivne nesporigene anaerobne bakterije su otporne na metronidazol.

31.6 Inkubacija

Zasijane podloge sa postavljenim diskovima antibiotika se inkubiraju na odgovarajućoj temperaturi u aerobnim, mikroaerofilnim ili anaerobnim uslovima, zavisno od vrste bakterija koje se ispituju (tabela br.11). Ploče su okrenute poklopcem na gore.

TABELA 11. Uslovi i vrijeme inkubacije za pojedine vrste bakterija

MIKROORGANIZMI	INKUBACIJA
enterobakterije	16 - 18 h, na 35 ± 2 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16 - 18 h, na 35 ± 2 °C
<i>Acinetobacter spp.</i>	20 - 24 h, na 35 ± 2 °C
<i>Burkholderia cepacia</i>	20 - 24 h, na 35 ± 2 °C
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	20 - 24 h, na 35 ± 2 °C
ostali nefermentujući Gram negativni bacili	16 - 20 h, na 35 ± 2 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	16 - 18 h, na 35 ± 2 °C
<i>Staphylococcus spp.</i>	24 h, na 35 ± 2 °C
<i>Staphylococci</i> (cefoksitin)	24 h, na 30 °C (ne preko 35 °C)
<i>Staphylococci</i> (vankomicin)	24 h, na 35 ± 2 °C
BHS grupa	20 - 24 h, na 35 ± 2 °C, 5% CO ₂
viridans grupa	20 - 24 h, na 35 ± 2 °C, 5% CO ₂
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	20 - 24 h, na 35 ± 2 °C, 5% CO ₂
<i>Enterococcus spp.</i>	16 - 18 h, na 35 ± 2 °C
<i>Enterococci</i> (vankomicin)	24 h, na 35 ± 2 °C
<i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i>	16 - 18 h, na 35 ± 2 °C, 5% CO ₂
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	20 - 24 h, na 36 ± 1 °C, 5% CO ₂
<i>Neisseria meningitidis</i>	20 - 24 h, na 35 ± 2 °C, 5% CO ₂
anaerobi	42 - 48 h, na 36 ± 1 °C

31.7 Čitanje rezultata

- Mjeračem sa milimetarskom podjelom se mjeri **prečnik zone inhibicije rasta** ispitivanog bakterijskog soja za pojedine antibiotike.
- Na osnovu izmjerenih vrijednosti prečnika zone inhibicije rasta vrši se procjena stepena osjetljivosti i svrstavanje u jednu od tri kategorije:

S (*sensitive*) – **osjetljiva** - Infekcija izazvana osjetljivim sojem liječi se uobičajenim (optimalnim) terapijskim dozama.

I (*intermediate*) – **umjereno osjetljiva** - Infekcija izazvana umjereno osjetljivim sojem liječi se višim terapijskim dozama antibiotika.

R (*resistant*) – **otporna** - Infekcija izazvana rezistentnim sojem ne može se liječiti ispitivanim antibioticima.

32 Identifikacija β -laktamaza proširenog spektra

32.1 Opšte napomene

- Beta-laktamaze proširenog spektra (eng. extended spectrum β -lactamases – ESBL) najznačajniji su uzrok rezistencije na cefalosporine 2. i 3. generacije.
- Proizvodnju ESBL kodiraju geni plazmida tako da je širenje među sojevima iste, ali i različitih vrsta jednostavno.
- Da bi otkrili produkciju ESBL koristimo skrining testove i fenotipski potvrdni test.
- Testiraju se sojevi: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* i *Proteus mirabilis*.
- Ukoliko su izolati: *Acinetobacter species*, *P. aeruginosa* i *Stenothrophomonas maltophilia*, ESBL testove ne treba raditi. U ovih bakterija produkcija ESBL je moguć, ali rijedak uzrok rezistencije, tako da se u rutinskom radu testiranje ne preporučuje. Osim toga, metode za skrining i potvrdne testove za ove izolate još nisu određene.
- Produkcija ESBL je često udružena sa rezistencijom na antibiotike koji ne pripadaju β -laktamskim antibioticima.

- Bakterije sa ESBL produkcijom je teško otkriti ako su u pitanju sojevi sa inducibilnim AmpC hromozomalnim enzimima.

32.2 Skrining test

- Zasniva se na standardnoj metodi izrade antibiograma disk difuzionom metodom uz korišćenje određenih cefalosporina kao indikatora moguće produkcije ESBL (tabela br.12).

TABELA 12. Kriterijumi za otkrivanja ESBL sojeva *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* i *P. mirabilis*

test	skrining test	fenotipski potvrdni test
metod	disk difuzija	disk difuzija
medijum	MHA	MHA
koncentracija lijeka	<p><i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>E. coli</i>* cefpodoksim 10 µg ili ceftazidim 30 µg ili aztreonam 30 µg ili cefotaksim 30 µg ili ceftriakson 30 µg</p> <p><i>P. mirabilis</i>* cefpodoksim 10 µg ili ceftazidim 30 µg ili cefotaksim 30 µg</p> <p>Koristiti više od jednog antibiotika za skrining ESBL produkcije!</p>	<p><i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>E. coli</i>, <i>P. mirabilis</i> **</p> <p>ceftazidim 30 µg ceftazidim/klavulanska kiselina 30/10 µg</p> <p>i</p> <p>cefotaksim 30 µg cefotaksim/klavulanska kiselina 30/10 µg</p> <p>Potvrda testiranja zahtjeva upotrebu sva 4 antibiotika za fenotipsku potvrdu ESBL produkcije</p>
inokulum	standardna disk-difuzija	standardna disk-difuzija
uslovi inkubacije	35 ± 2 °C, aerobno	35 ± 2 °C, aerobno
trajanje inkubacije	16 – 18 h	16 – 18 h
rezultat	<p><i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>E. coli</i></p> <p>cefpodoksim zona ≤ 17 mm ceftazidim zona ≤ 22 mm aztreonam zona ≤ 27 mm cefotaksim zona ≤ 27 mm ceftriakson zona ≤ 25 mm</p>	Razlika ≥ 5 mm između zona inhibicije rasta oko cefalosporina i njegove kombinacije sa klavulanskom kiselinom ukazuje na ESBL produkciju.

	<i>P. mirabilis</i> cefpodoksim zona ≤ 22 mm ceftazidim zona ≤ 22 mm cefotaksim zona ≤ 27 mm Manje zone ukazuju na ESBL produkciju.	Razlika < 5 mm između zona inhibicije rasta oko cefalosporina i njegove kombinacije sa klavulanskom kiselinom ukazuje da soj ne produkuje ESBL.
izvještavanje		nije obavezno

- Osjetljivost ispitivanog bakterijskog soja se procjenjuje nakon mjerenja prečnika zone inhibicije rasta u skladu sa kriterijumima koji su standardizovani.
- Skrining test se smatra pozitivnim ukoliko je nađena rezistencija na cefpodoxim, ceftazidim, aztreonam, cefotaxim ili ceftriakson.
- Ukoliko je skrining test pozitivan treba uraditi fenotipski potvrdni test.

32.3 Kontrole testova koji se koriste za otkrivanje ESBL

- Kao pozitivna kontrola se preporučuje *E.coli* ATCC 35218.

32.4 Tumačenje nalaza

- Dokazana ESBL produkcija ima samo epidemiološki značaj, pa izvještavanje nije neophodno.
- U nalazu ne naglašavamo da je izolovani soj rezistentan na peniciline, cefalosporine i aztreonam, bez prethodne izrade antibiograma koji uključuju navedene antibiotike.

33 Identifikacija karbapenemaza produkujućih sojeva

33.1 Skringing test

- Zasniva se na standardnoj metodi izrade antibiograma disk difuzionom metodom uz korišćenje diska meropenema od 10 µg, kao indikatora mogućih karbapenemaza produkujućih izolata enterobakterija.
- Klinički *cut-off* za meropenem je 22 mm, tako da su svi izolati čiji je prečnik zone veći od 22 mm osjetljivi na ovaj lijek.
- Epidemiološki *cut-off* je 25 mm, tako da izolati čija je zona inhibicije manja od 25 mm su sumnjivi da luče karbapenemaze.
- U nalazu naglašavamo da je izolovana bakterija osjetljiva na meropenem, ali postoji mogućnost da je nosilac gena koji je odgovoran za rezistenciju na karbapeneme.
- Ukoliko je skringing test pozitivan, potrebno je soj poslati u laboratoriju koja obavlja poslove referentne laboratorije, kako bi se uradio fenotipski potvrdni test.

DODATAK: Način pripremanja hranljivih podloga koje ne postoje u praškastom obliku kao gotove podloge

Obogaćeni čokoladni agar

- Sipati 5 gr hemoglobina u prahu u bocu od 500 ml sa perlama.
- Dodati 250 ml destilate (prvo malo da se razbije hemoglobin, a zatim se dodaje do 250 ml).
- Kuvati na plameniku uz često mućkanje, pa presuti u drugu Erlermajerovu bocu bez perlica.
- U drugu Erlermajerovu bocu izmjeriti 18 gr GC medium baze (ili 19,5 gr Thayer Martin baza) i 250 ml vode, i to homogenizovati.
- To se sve sterilise 15 minuta na 121°C u autoklavu (autoklaviraju se odvojeno hemoglobin i baza, pa se po autoklaviranju sjedine).
- Kad se podloga rashladi na 50°C dodaje se 5ml poliviteksa (1 ml poliviteksa na 100 ml podloge), homogenizuje se i nakon toga se razliva u Petrijeve ploče.

Selektivni čokoladni agar za *Haemophilus spp.*

- Sipati 5 gr hemoglobina u prahu u Erlermajerovu bocu od 500 ml sa perlama.
- Dodati 250 ml destilate (prvo malo, da se razbije hemoglobin, zatim dodati do 250 ml).
- kuvati na plameniku uz često mućkanje, a zatim presuti u drugu Erlermajerovu bocu bez perlica.
- Podlogu sterilisati u autoklavu 15 minuta na 121°C i nakon toga je ohladiti na 50°C.
- U tako ohlađenu podlogu dodati bacitracin (2 ml bacitracina na 500 ml podloge) i 5 ml dodatka sa X i V faktorima rasta (1ml ovog dodatka na 100 ml podloge).
- U drugu Erlermajerovu bocu izmjeriti 18 gr GC medum baze i 250ml vode, i to homogenozovati.
- Sterilisati u autoklavu 15 minuta na 121°C.
- Kad se podloga ohladi na 50°C, pomiješati sadržaj iz obje boce.
- Tako pripremljenu podlogu razliti u Petrijeve ploče.

VCN čokoladni agar

- Otopiti 18 gr GC AGAR BASE u 250 ml destilovane vode i sterilisati u autoklavu 15 minuta na 121° C.
- U drugu tikvicu (sa perlama) sipati 5 gr hemoglobina u prahu i dodati 250 ml vode (prvo malo, da se razbije hemoglobin, zatim dodati ostatak do 250 ml).
- Kuvati na plameniku uz često miješanje i presuti u drugu Erlermajerovu bocu bez perli. Sterilisati u autoklavu 15 minuta na 121°C.
- Autoklaviran i ohlađen na 50°C sadržaj iz obje tikvice se sjedini i doda se 5 ml dodatka sa X i V faktorima rasta i 5 ml VCN dodatka (1 ml na 100 ml podloge).
- Tako pripremljena podloga se razliva u Petrijeve ploče.

Podloga za anaerobe

- Otopiti 10,4 gr BRAINT HEART INFUSION AGAR u 200 ml destilovane vode.
- Sterilisati u autoklavu 15 minuta na 121°C.
- Kad se autoklavira i ohladi na 50°C dodati 0,2 ml vitamina K, 0,5 ml pripremljenog i sterilisanog hemoglobina i 10 ml defibrinisane ovčije krvi.
- Tako pripremljenu podlogu razliti u Petrijeve ploče.

Selektivna podloga za *Campylobacter* spp.

- Otopiti 10 gr podloge COLUMBIA AGAR u 250 ml destilovane vode i sterilisati u autoklavu 15 minuta na 121°C.
- Kad se ohladi na 50°C dodati 5-10% (15 ml) defibrinisane ovčije krvi i 2,5 ml dodatka sa mješavinom antibiotika za *Campylobacter* podlogu (jedna flašica se rastvara sa 2 ml aqua redestilata)
- Tako pripremljenu podlogu razliti u Petrijeve ploče.

Podloga za ispitivanje osjetljivosti gonokoka na antibiotike

- Otopiti 7,2 gr MEDIUM BASE u 100 ml destilovane vode. Zagrijevati na plameniku do ključanja (da ključa oko 1 minut).
- Sterilisati u autoklavu 15 minuta na 121°C. Ohladiti na 50°C i dodati dodatak sa X i V faktorima rasta: 2ml na 100 ml podloge.
- Lagano miješati u jednom pravcu 3 puta i 3 puta u drugom pravcu (da se ne stvore mjehurići). Tako pripremljenu podlogu razliti u Petrijeve ploče (ne spaljivati ploče).

Literatura

1. Bradbury S.M. Collection of urine specimens in general practice-to clean or not to clean? *J R Coll Gen Pract* 1988; 38: 363-365.
2. Cheesbrough M. Collection and transport of specimens. Examination of specimens. In: *Medical laboratory manual for tropical countries*. Cheesbrough M. Ed. 100-199. Butterworth-Heinemann Ltd. Cambridge, 1993.
3. Health Protection Agency. National Standard Method. <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/>
4. Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C. The role of the microbiology laboratory in the diagnosis of infectious diseases: guidelines to practice and management. In: *Diagnostic microbiology*. Winters R. Ed. 1-15. J.B.Lippincott Company, Philadelphia, 1992.
5. Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C. Guidelines for collection, transport, processing, analysis, and reporting of cultures from specific specimen types. In: *Diagnostic microbiology*. Winters R. Ed. 61-104. J.B.Lippincott Company, Philadelphia, 1992.
6. Kunin C.M. Detection, prevention and management of urinary tract infections: A manual for physician, nurse and allied health worker. 2nd ed. Lea and Febiger, Philadelphia, 1974.
7. Mahon C.R., Manuselis G. Laboratory diagnosis of gastrointestinal pathogens. In: *Diagnostic microbiology*. Fabion K. Ed. 965. Saunders, Philadelphia, 2000.
8. Pelemiš M.R., Lavadinović L. Antimikrobna terapija gram negativnih infekcija. U: *Antibiotici 2001*. Prostran M. Ed. 231-275. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 2001.
9. Radna Grupa za standardizaciju metodologije i interpretacije rezultata antibiograma, Srpsko lekarsko društvo-Mikrobiološka sekcija. Izmene i dopune «Priručnika za izradu antibiograma», Institut za imunologiju i virusologiju «Torlak», Beograd, 2001.
10. Shanson D.C. Blood culture technique: current controversies. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25(suppl): 17-29.
11. Škerk V. Infekcije mokraćnog sustava-novosti u patogenezi i liječenje. *Medicus* 2003; 12(2): 197-204.
12. Švabić-Vlahović M., Đukić-Ivančević S., Dakić I., Mijač-Vasiljević V., Opavski N. Uzimanje i slanje materijala na bakteriološki pregled. U: *Praktikum iz mikrobiologije i imunologije*. Jovanović T. i sar. Eds. 16-23. Savremena administracija, Beograd, 2000.
13. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing; Twenty- Fourth Informational Supplement. CLSI document M100- S24, 2014.



www.mzd.gov.me