

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Медицински факултет - Скопје
Институт за микробиологија и паразитологија

**ЗНАЧЕЊЕТО НА МИКРОБИОЛОШКАТА
ДИЈАГНОСТИКА ВО КЛИНИЧКАТА
ПРАКСА – респираторни инфекции**

Виш научен соработник д-р. Весна Котевска

СОДРЖИНА

- Општи карактеристики на микроорганизмите
- Клиничка микробиологија
- Микробиолошка дијагностика – фази на тестирање
- Правилно собирање на примероци од горни и долни дишни патишта, културелно испитување..
- Идентификација на микроорганизми
- Основни принципи на толкување ма микробиолошки наоди
- Толкување на наоди од респираторен тракт

Општи карактеристики на микроорганизмите

Микроорганизми (микроби)
(micros = **мал**; bios = **жив**)

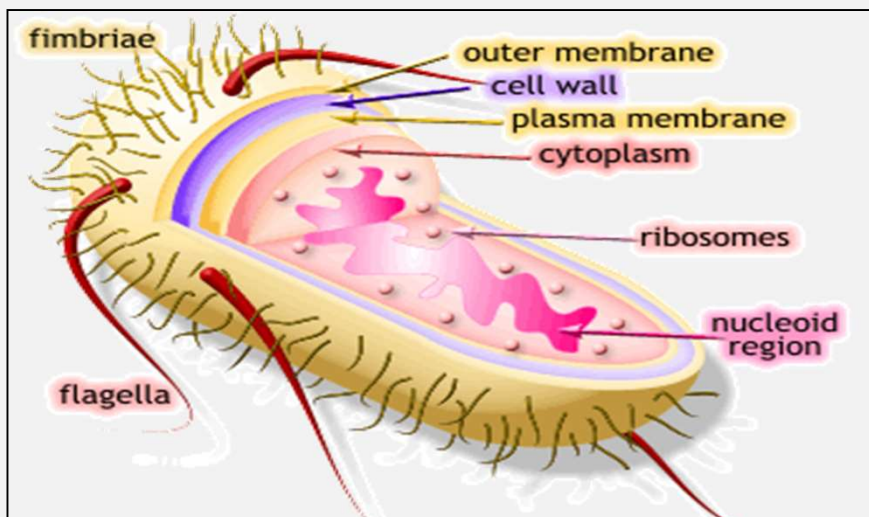
Поделба

- БАКТЕРИИ
- ВИРУСИ
- ГАБИ
- ПАРАЗИТИ
- ПРИОНИ

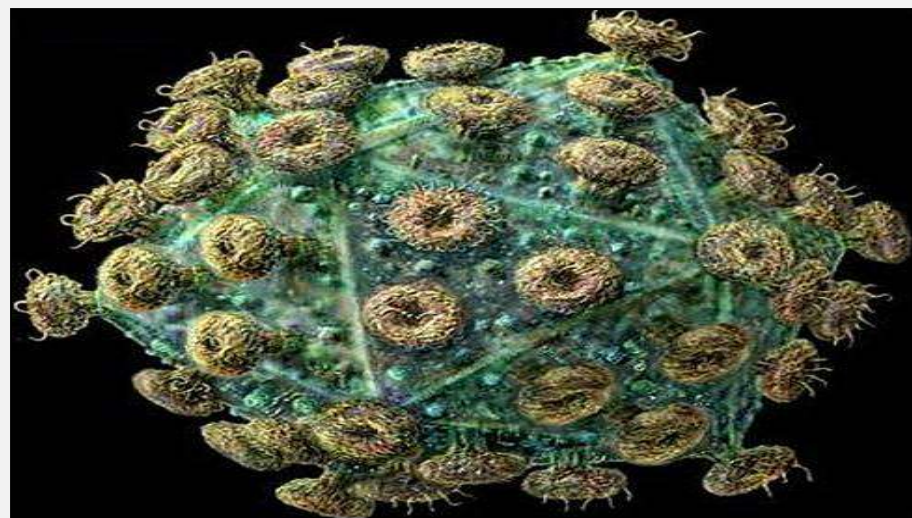
Микроорганизми: најстар облик на живот на земјата

Групи	Вкупен број видови	Познати видови	% Познати видови
Вируси	130.000	 5.000	4
Бактерии	40.000	 4.760	12
Фунги	1.500.000	69.000	5
Протозои	100.000	30.800	31

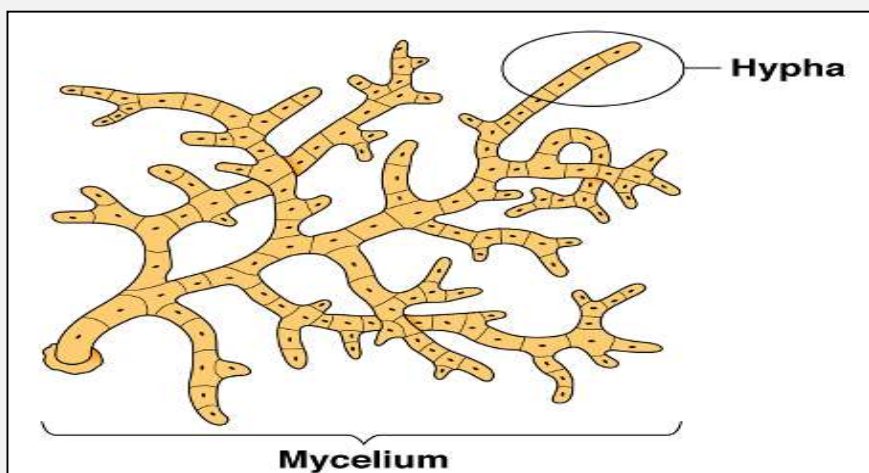
Микроорганизми: поделба



Градба на бактериска клетка



Вирус - (жива кл.; или ДНК или РНК)



Морфолшки особи на мувли



Приони – нема ДНК

Микроорганизмите и нивната патогеност

Многу малку микроорганизми се
секогаш патогени

Многу микроорганизми се
потенцијално патогени

Повеќе микроорганизми
НЕ се патогени



Клиничка микробиологија

Микроорганизми

- БАКТЕРИИ
- ВИРУСИ
- ГАБИ
- ПАРАЗИТИ
- ПРИОНИ

Клинички примероци од хумано потекло

- . Крв
- . Ликвор
- . Урина
- . Феџес
- . Брисеви од: нос, грло
- . Спутум
- . Гној...



ДИЈАГНОЗА
(ЕТИОЛОШКИ)



ПРЕВЕНЦИЈА



ТЕРАПИЈА

Микробиолошка дијагностика: фази на тестирање

. **Преданалитичка**

(АДЕКВАТНО: собирање на примерок, означување, транспорт, чување)

. **Аналитичка**

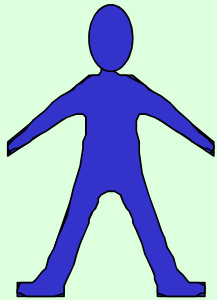
(испитување: микроскопско, културелно, биохемиско, молекуларно, серолошко, автоматизирана дијагностика, антибиограм)

. **Постаналитичка**

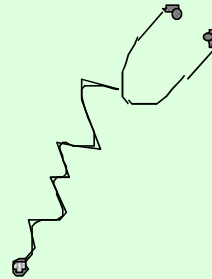
(толкување на резултати од микробиолошки анализи)

Дијагноза на бактериски инфекции

Пациент



Клиничка
дијагноза

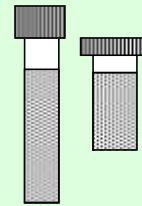


НЕ – микробиолошки
испитувања

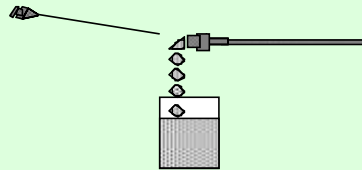
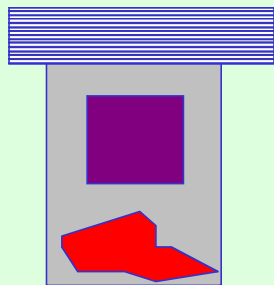
Радиологија



Хематологија
Биохемија



Примерок



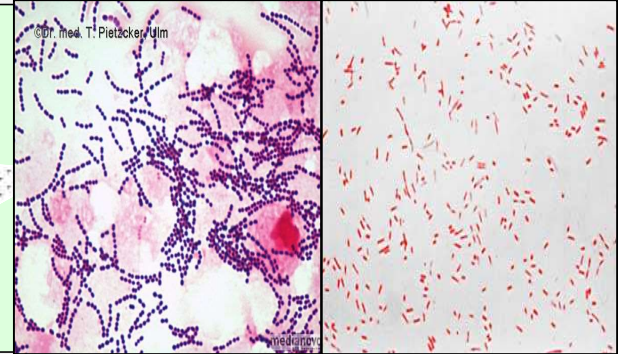
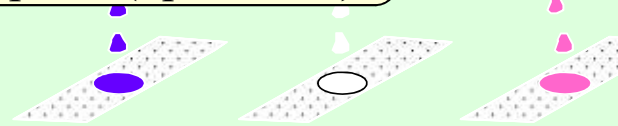
- Земање на „ТОЧЕН примерок
- АДЕКВАТНО собирање на примерок
- ПРАВИЛНО затворен и ОБЕЛЕЖАН примерок
- Соодветно ТРАНСПОРТ и ЧУВАЊЕ на примерок

Дијагноза на бактериски инфекции

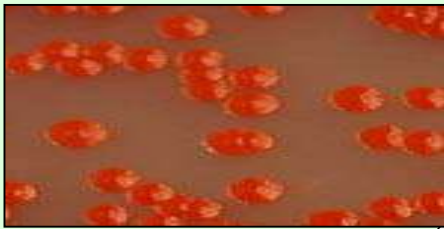


Микроскоп

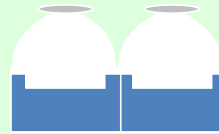
Нативни или обоени препарати (пр. ГРАМ)



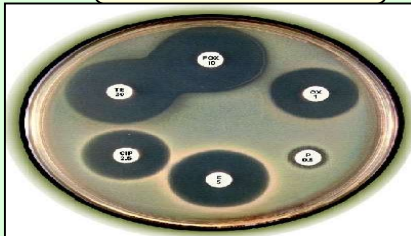
Култура



Идентификација со биохемиските тестови



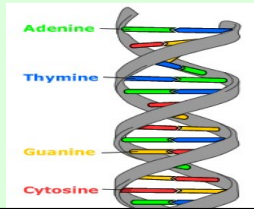
Осетливост



АНТИБИОГРАМ
или МИК



Серолошки тестови



Молекуларни
методи

Микробиолошка дијагноза: собирање на примероци



Основни правила за земање примероци



„Вистинско место”, инфективен процес (можна контаминација со физиолошка микрофлора од други органи, ткива, секрети)

„Вистинско време” (патогенеза, клинички манифестации)

Доволно количество (пр. мало количество - лажно негативен наод)

Стерилна опрема со асептични мерки на работа (стерилни садови, добро затворени: можно истекување или контаминација при транспорт)

Пред почетокот на антибиотска терапија (важен податок за толкување на наод; контрола на спроведена терапија)

Постапка на земање на примерок (ако пациент сам зема примерок: урина, спутум)

Основни правила за земање примероци



- **Спроводна листа со основните податоци за болниот**
 - **Клиника; оддел** (хоспитален или амбулантски пациент)
 - **Возраст**
 - **Пол**
 - **Дата и време** на земање на примерок
 - **Вид** на примерок
 - **Клиничка дијагноза**
 - **Антибиотска терапија**
 - Да се назначи **прецизно за изолација на ретки микроорганизми**
 - **Котролен преглед**
 - **Претходно изолиран микроорганизам**
 - **Потпис на лекар**

**Основни правила за земање
примероци од дишни патишта
(брис од грло, нос, спутум..)**

Земање на брис од грло



. Деца и пациенти кои не соработуваат:
дополнителна асистенција; фиксирање
на: глава, чело, раце..)



Чување на примерок:

25° C (собна тем.), засадување за 2-3^h; за одложено засадување од неколку часа брисот се чува во фрижидер (4° C); Ако треба да стои подолго време (пр. 24^h) транспортен медиум.

**ЗЕМАЊЕ НА ПРИМЕРОК
КАЈ ПОГОЛЕМИ ДЕЦА**



ЗЕМАЊЕ НА БРИС ОД ГРЛО

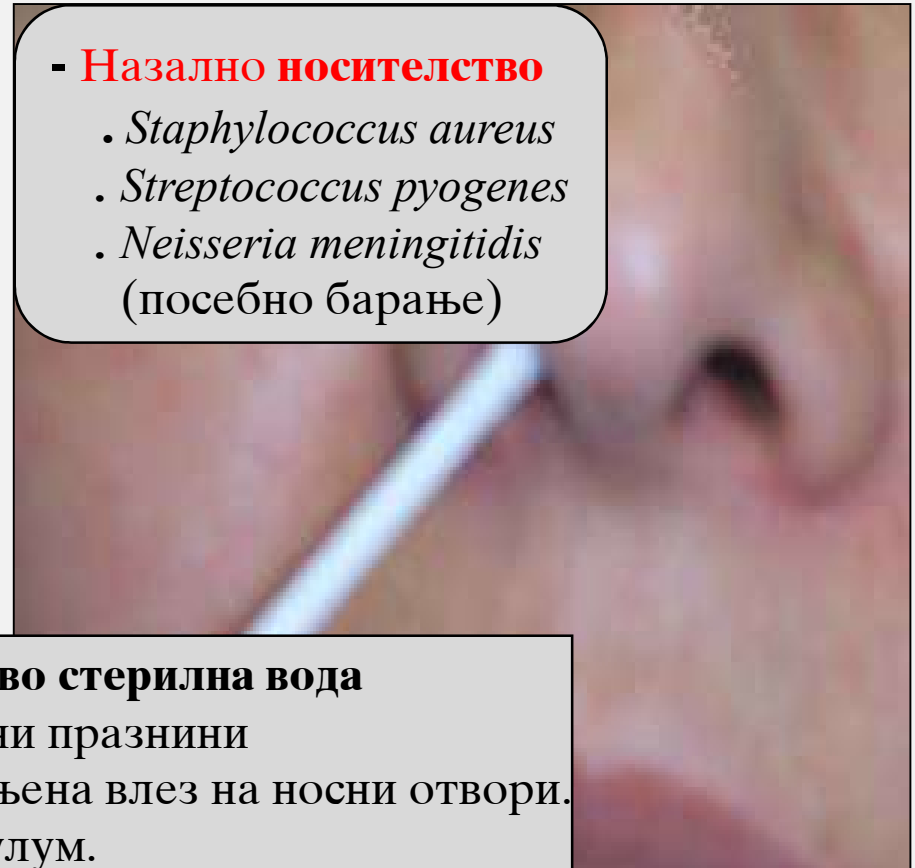


Земање на брис од нос



- Назално носителство

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Neisseria meningitidis*
(посебно барање)



- Брисот се натопува во стерилна вода
 - се вовлекува во носни празнини
 - се избегнува допирањена влез на носни отвори.
- Најдобро: под спекулум.

Чување на примерок:

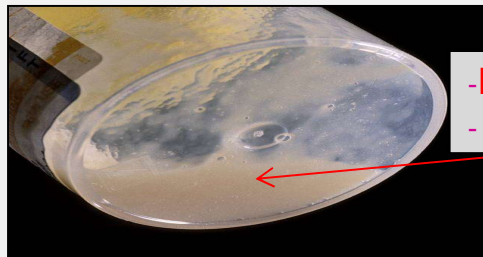
25° C (собна тем.), засадување за 2-3^h; за одложено засадување од неколку часа брисот се чува во фрижидер (4° C); Ако треба да стои подолго време (пр. 24^h) трансп. медиум.

Собирање на спутум (искашлок)

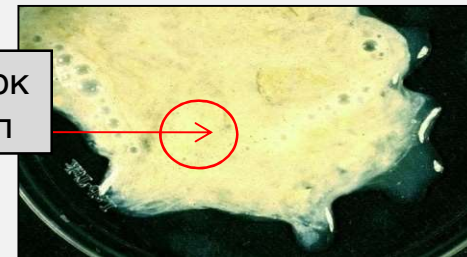


- Се икашлува по **тоалета на усна празнина** (5-6 пати плакнење на усна празнина со вода)
- Чување: **+4°C**; 5-6^h во фрижидер; Засадување: еднакви количества од гнојни делови

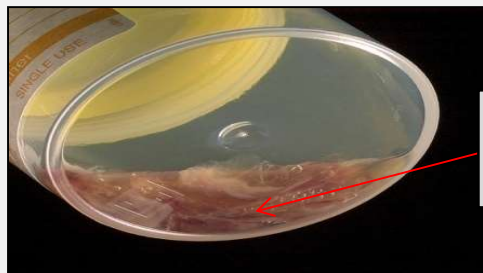
Спутум: квалитет на примерок



- **ГНОЕН** зеленкаст примерок
- се култивира било кој дел



- **ПЛУНКА** воденест примерок
- неадекватен за култивирање



- **КРВАВ** примерок
- се култивира било кој дел



- **МУКОИДЕН** примерок
- се култивираат мукоидни делови (белчести или зеленкасти дамки)



Идентификација на патогени

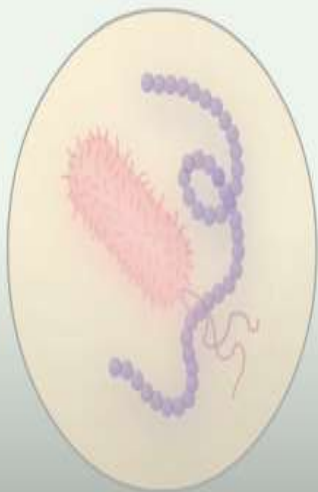


Испитување на:

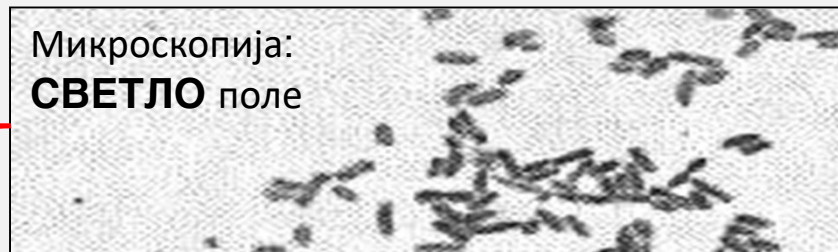
- **морфолошки особини**
- **културелни особини**
- **физиолошко-биохемиски** карактеристики
(конвенционални тестови; автоматизирани техники)
- **имунолошки методи**
- **молекуларни методи**
- **експерименти со лабораториски животни**

Микроскопско испитување на морфолошки особини

Микроскоп
светлосен



Микроскопија:
СВЕТЛО поле



Микроскопија:
ТЕМНО поле



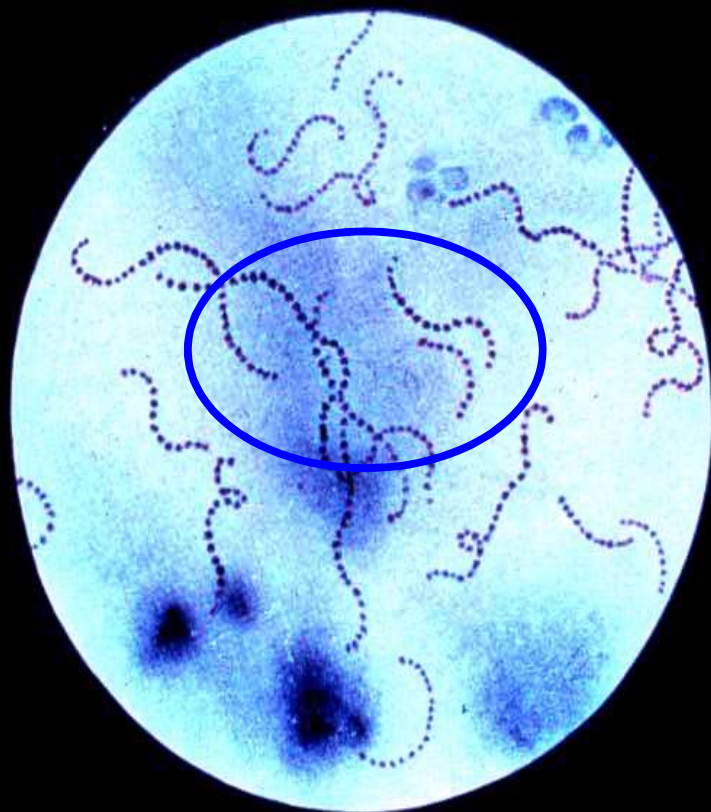
ФАЗНО КОТРАСТЕН
микроскоп



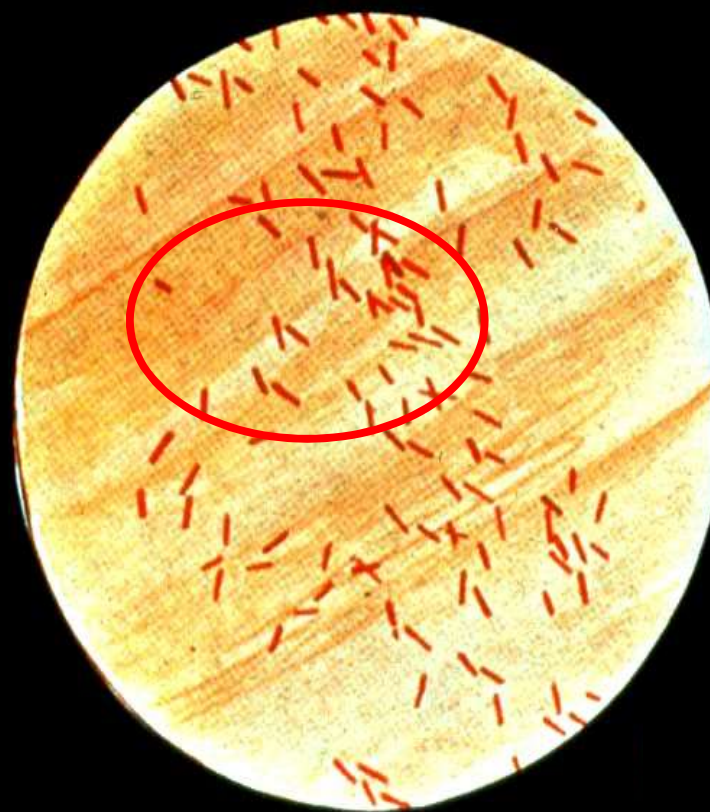
ФЛУОРЕСЦЕНТЕН
микроскоп



Препарати од **култура** обоени по **Грам**

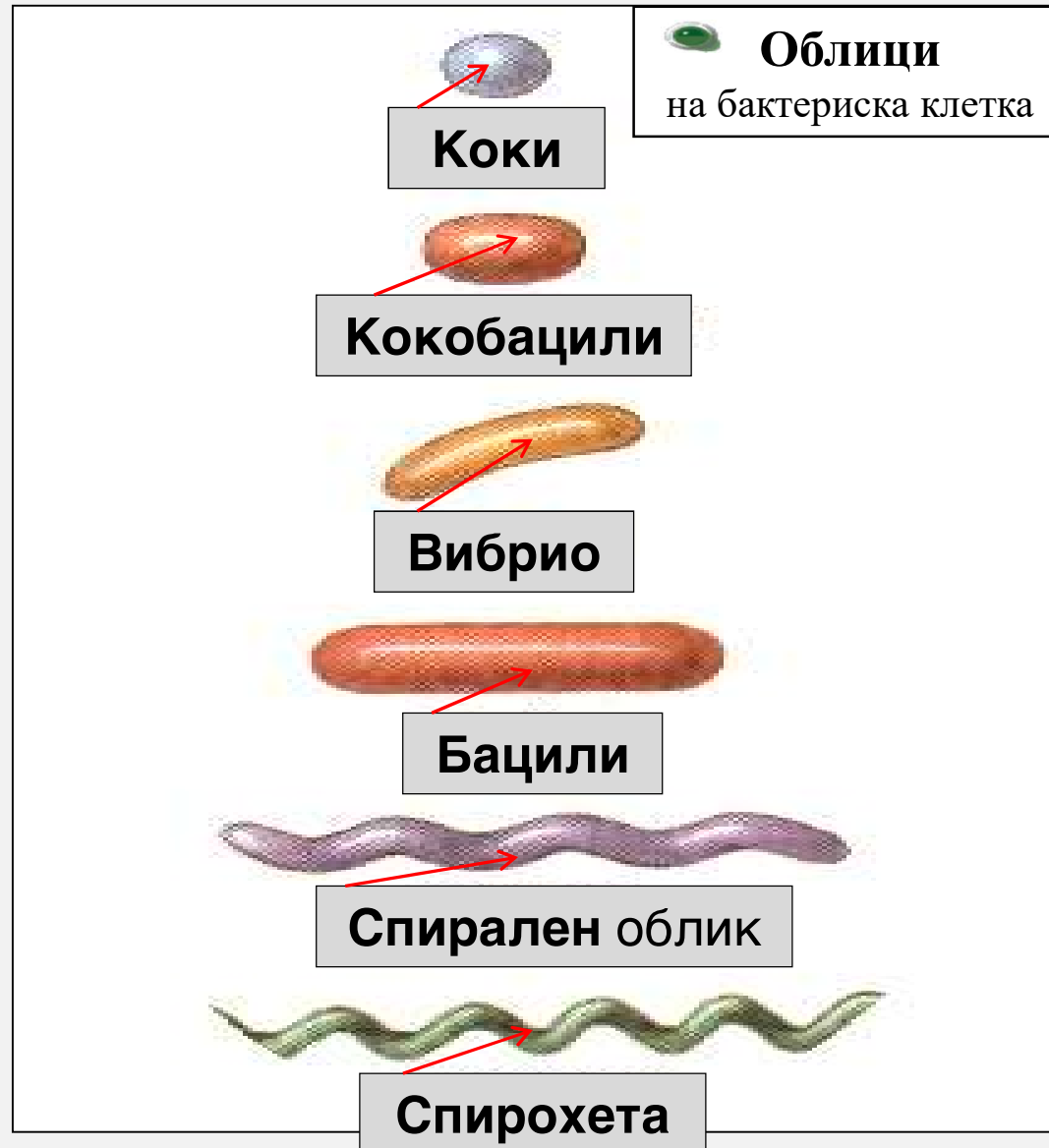


ГРАМ - позитивни коки (ланци)



ГРАМ негативни бацили

Микроскопско испитување на морфолошки особини



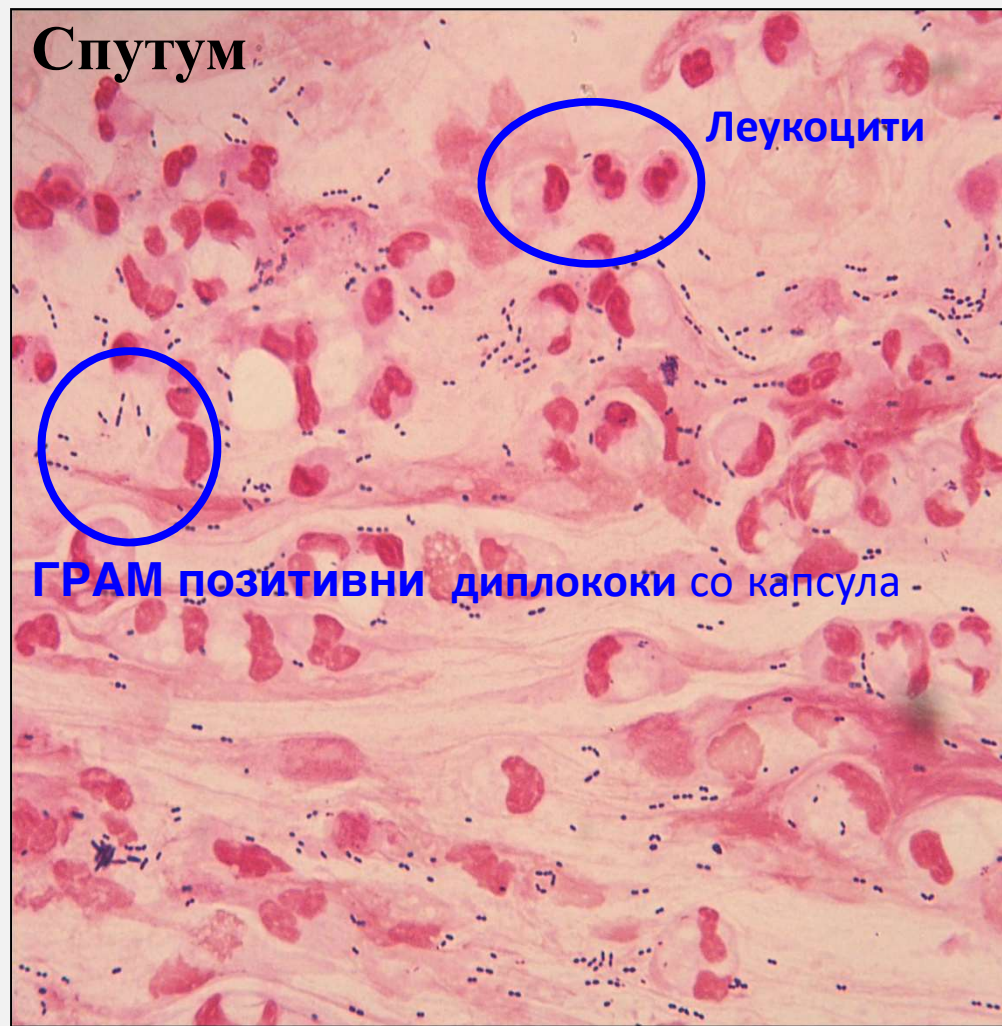
- Тинторелни особини
- Облик
- Големина
- Распоред
- Број
- Капсула
- Спори
- Флагели
- Гранули
- Подвижност

Директни препарати обоени по Грам

Брис од рана



Спумум



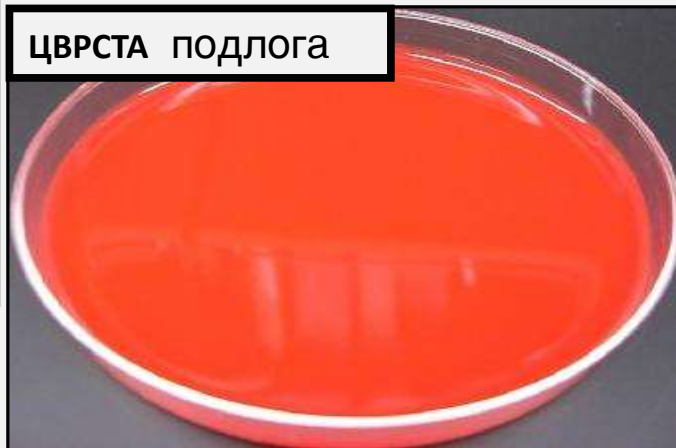
Културелно испитување

- Изолирање/идентификација: **предизвикувачи** на заразни заболувања
- Испитување на **осетливост кон антибиотици и хемиотерапевтици** (антибиограм)
- Број на **живи бактерии** (урина, храна, вода)
- Контрола на **стерилност** (лекови, хируршки инструменти, крв, операциони сали..)

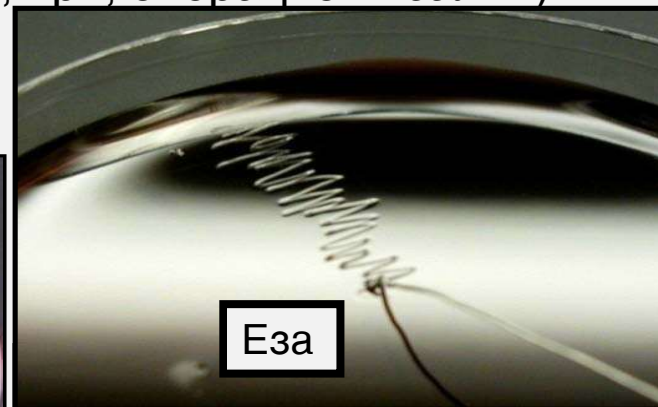
ТЕЧНА подлога (БУЈОН)



ЦВРСТА подлога



Еза



Брис



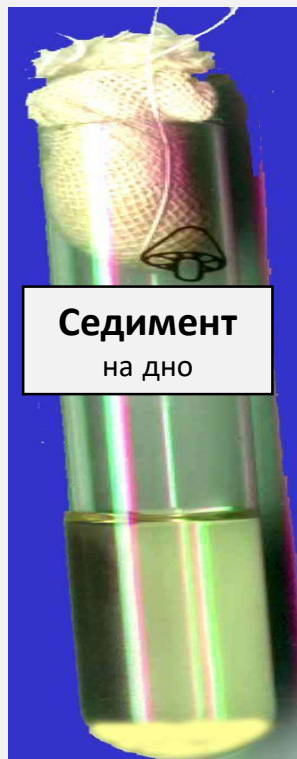
ПОЛУЦВРСТА подлога



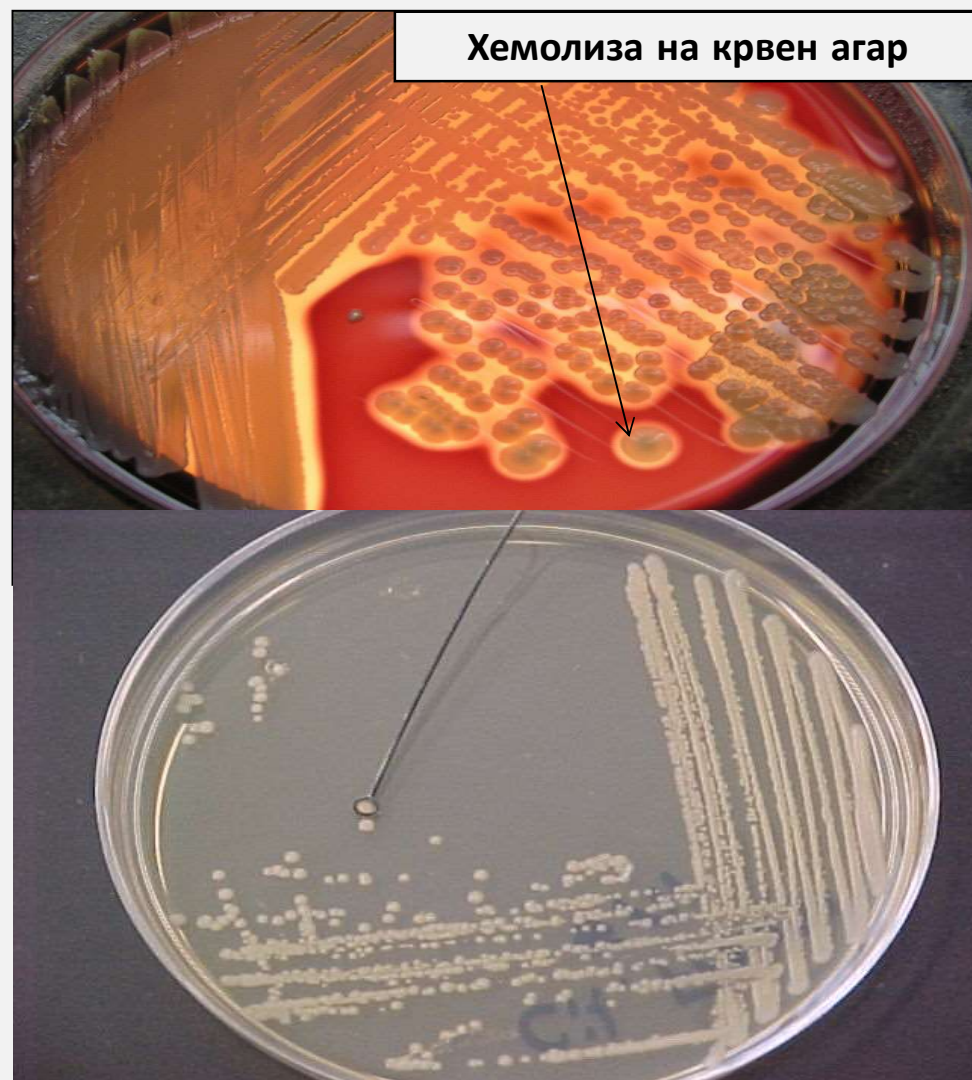
Инкубација во термостат



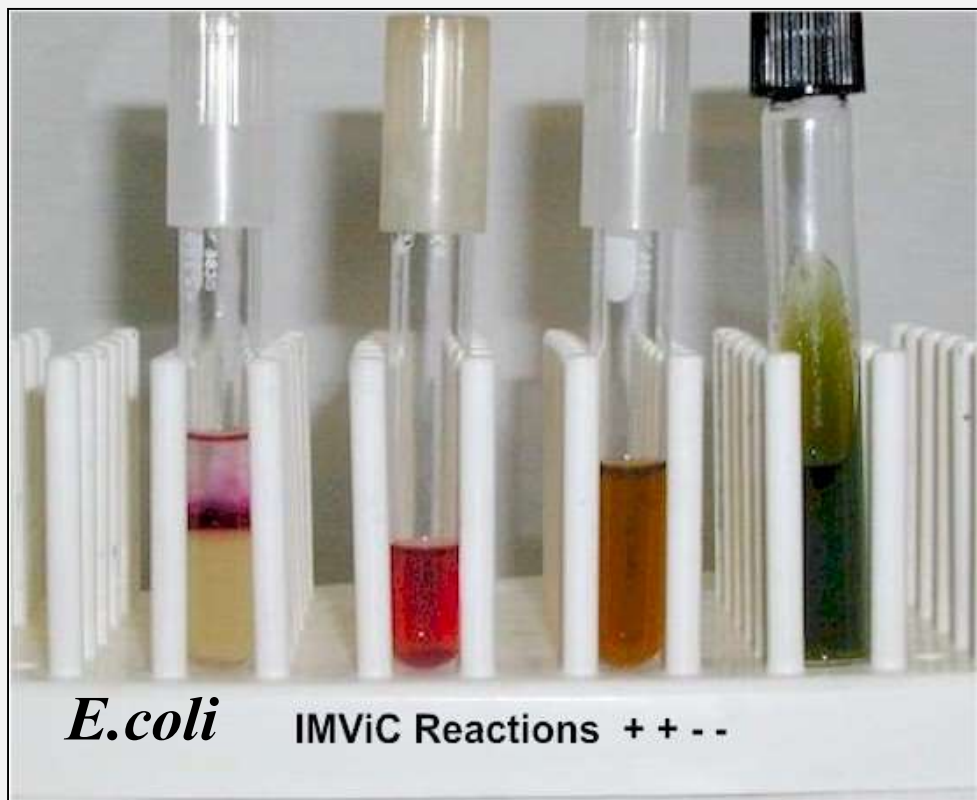
Раст во течни подлоги



Раст на цврсти подлоги

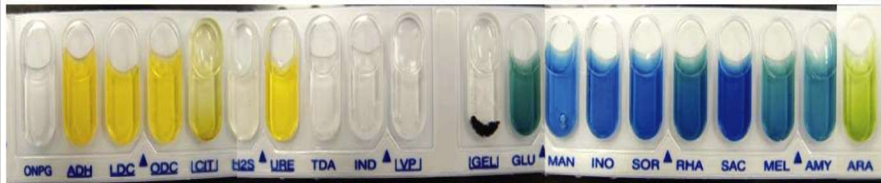


Испитување на физиолошко-бихемиски особини на бактериите



API 20E систем

A. Uninoculated strip



B. *E. coli* results after 24 hours



C. *P. mirabilis* results after 24 hours



Се анализираат 20 маркери

Автоматизирана дијагностика VITEK – 2 СИСТЕМ



Картичка со бунарчиња - **биохемиски реакции** - идентификација на бактерија

ИСПИТУВАЊЕ НА ОСЕТЛИВОСТ...

❖ Квалитативно

(осетливи: **ОС**, умерено осетливи: **УО**, резистентни: **Р**)

❖ Квантитативно

(минимални инхибиторни конценрации и минимални бактерицидни концентрации)

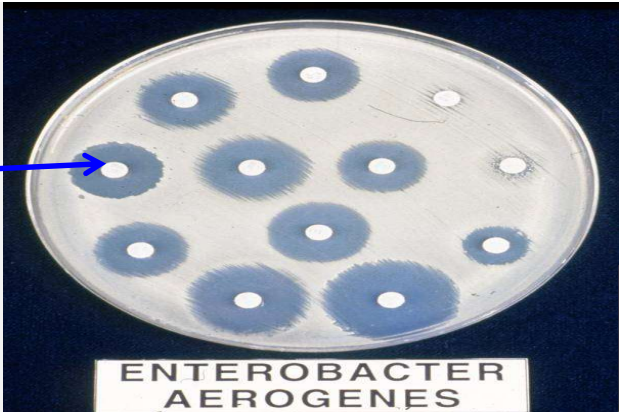
- **МИК; минимални инхибиторни конценрации**

(најмала коцентација на антибиотик која инхибира раст и размножување на бактериски клетки; интерпретација: **ОС**, **УО**, **Р**)

- **МБК; минимални бактерицидни концентрации**

(најмала коцентација на антибиотик која ги убива бактериските клетки)

. Дифузионен метод



. Дилуциони методи

- агар
- бујон

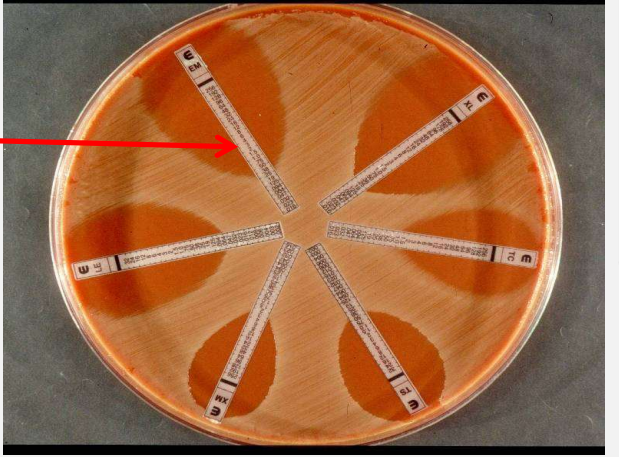
MIC the "Gold standard" for Determining Susceptibility

Antibiotic is incorporated into agar in doubling dilutions up and down from 1 mg/L. 10⁶orgs/spot applied to plates before incubation. After incubation examine for growth (dark spot)

Wolverhampton September 2008

. Комбинирани методи

- . Е тест
- . Линија на регресија



INSTITUT MIKROBIOLOGIJA I PARAZITOLOGIJA

bioMerieux Customer: **Laboratory Report** Printed Apr 19, 2010 10:34 CEST
System #: Printed by: gordana

Patient Name: nastav petre Patient ID: 01157
Isolate Group: 2971/s-1
Bionumber: 03400326571771
Selected Organism: Enterococcus faecium

Comments:

Identification Information	Card: GP	Lot Number: 242124740	Expires: May 14, 2010 13:00 CEST
	Completed: Aug 15, 2009 16:55 CEST	Status: Final	Analysis Time: 5.75 hours
Selected Organism	96% Probability Bionumber: 03400326571771		Confidence: Excellent identification
SRF Organism	Enterococcus faecium		
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			
Enterococcus faecium dRAF(15).			

Susceptibility Information	Card: AST-P534	Lot Number: 184124740	Expires: May 14, 2010 13:00 CEST		
	Completed: Aug 15, 2009 18:09 CEST	Status: Final	Analysis Time: 7.00 hours		
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Benzylenicillin	>= 64	R	Moxifloxacin	>= 8	R
Ampicillin	>= 32	R	Norfloxacin	>= 16	R
Ampicillin/Subactam	>= 32	R	Erythromycin	>= 8	R
Cefuroxime	>= 64	R	Clindamycin	>= 8	R
Cefuroxime Axetil	>= 64	R	Quinupristin/Dalfopristin	0.5	S
Imipenem	>= 16	R	Linezolid	2	S
Gentamicin High Level (synergy)	SYN-R	R	Teicoplanin	<= 0.5	S
Kanamycin High Level (synergy)	SYN-R	R	Vancomycin	>= 32	R
Streptomycin High Level (synergy)	SYN-R	R	Tetracycline	<= 1	S
Ciprofloxacin	>= 8	R	Nitrofurantoin	64	I
Levofloxacin	>= 8	R	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	<= 10	*R

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

За правилна клиничка одлука !

- **Причинител или колонизатор???**
- **Кој е изолираниот агенс?**
- **Од каде е изолиран?**
- **Дали примерокот е примарно стерилен?**
- **Дали е нормален жител?**
- **Стриктно или условно патоген?**
- **Интрахоспитална инфекција: ендегена или егзогена?**
- **Дали е можно да се работи за контаминација?**

Основни принципи на толкување на резултати од микробиолошки анализи

Дијагностичките тестови:



- поставување на **дијагноза на болест**
- **згрижување** на пациент:
проценка на тежина на болест, прогноза,
нејзин тек, повторување, избор на лекови
за терапија

Фактори кои имаат влијание на резултатите од дијагностичките тестови

-Надворешни

(пр. употреба на лекови)

-Внатрешни

(пр. невообичаени физиолошки состојби)

. **Земање** на примерок

. **Транспорт** на примерокот

. **Обработка** на примерок:

- **конвенционална** дијагностика
- **брза** дијагностика
- **молекуларна** дијагностика

. **правилно толкување на резултатите**

Резултати од микробиолошки анализи

- **Вид** на изолиран микроорганизам, **резултати од серологија..**
- **Квантификација***
- **Антибиограм /антимикограма***
- Напомена, пр. **неадекватен примерок за анализа...***

** не секогаш, зависи од примерок и околности*

Најчести проблеми при толкување на резултати од микробиолошки анализи

- **Конвенционална микробиолошка дијагностика**
 - **Лажно негативен** наод
 - **Лажно позитивен** наод
 - **Физиолошка микрофлора**
 - Резултати од **квантитација** на микроорганизми
 - **Антибиограм / антимиограм**
- **Серологија**
- **Молекуларна анализа**

Лажно негативен наод

- . Неадекватно земен примерок !
- . Неадекватен транспорт
- . Неправилно пополнета листа (упатница) за анализа

проблем: *Brucella, Legionella, Mycoplasma, Mycobacteria* и др.
микроорганизми за кои се потребни посебни „ин витро“ услови за раст и размножување
- **Анаеробни** микроорганизми

Лажно позитивен наод

Контаминација со микроорганизми (физиолошка микрофлора или микроорганизми од околината)

**Толкување на наоди од
респираторен тракт !**

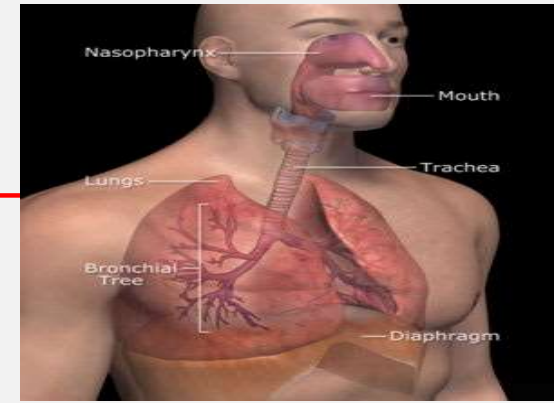
АКУТНИ РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ (АРИ)

најчести **заболувања** кај луѓето

најчести причини за **посета на лекарите** во примарна здравствена заштита

најчесто: **вирусна** етиологија (вирусолошка дијагностика !!!)

најчесто лекувањето: **емпириско** (голем број етиолошки причинители;
ретко се докажуваат, освен бактерискиот предизвикувач на фарингит: *S. pyogenes*)



АРИ



2/3 од сите инфекции

Фреквенција на заболувања во тек на **1 година**



- возрасен: **2 - 4**
- деца: **6 - 8!**
- колекти

. најчеста причина за хоспитализација на доенчиња и мали деца во развиени земји

НАЈЧЕСТИ ПРЕДИЗВИКУВАЧИ НА ИНФЕКЦИИ НА ДИШНИ ПАТИШТА

Локализација на заболување	Заболување	Група на патогени	Коментар (најчести предизвикувачи)
ГОРНИ ДИШНИ ПАТИШТА			
Носни ходници	Настинка	Вируси	Риновириси
Синуси	Sinusitis/ rhinosinusitis	Вируси Бактерии	Вируси
Фаринкс	Pharyngitis 	Вируси  <i>Streptococcus pyogenes</i> гр. А β -хемолитични стрептококи (С, G, В) <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Вируси (80-90%) 
Епиглотис	Epiglottitis	Бактерии	<i>Haemophilus influenzae</i> тип b
ДОЛНИ ДИШНИ ПАТИШТА			
Трахеа и бронхи	Bronchitis Tracheobronchitis Croup, Laryngitis	Вируси	Вируси
Бронхиоли	Bronchiolitis	Вируси	Респираторен синцицијален вирус
Алвеоли	Pneumonia	Бактерии	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (возрасни)

Примероци од **ГОРНИ** дишни патишта

Брис од **грло**

Брис од **епиглотис**

Брис од **уста**

Брис од **нос** *

Брис од **назофаринкс** !

Аспират од **назофаринкс** !

Брис од **орален апсцес / аспират**

Аспират од **синуси** **

* Брис од **нос** - не е релевантен примерок за дијагноза на инфекции на **средно уво, синусит, долни дишни патишта**



• **Тимпаноцентеза:** воспаление на **средно уво**

** Аспират од **синуси** („златен стандард,): **синусит**

Брис од **грло**: ФАРИНГИТ

■ *Streptococcus pyogenes* - гр. **A** најчесто, гр. **C**; гр. **G** бета хем. стрептококи

* Ретко, со **посебно барање** може да се исклучат фарингити предизвикани од:

- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Arcanobacterium hemolyticum*
- *Corynebacterium diphtheriae*
- *Borrelia vincentii* + *Fusobacterium* spp.
- *Candida* spp.
- *Neisseria meningitidis* (носителство)
- Вирусен фарингит
- *Mycoplasma*

* Забелешка:

Неопходно - **посебно барање од лекар**. Задолжително: **транспортни медиуми**

Брис од нос: РЕЗУЛТАТИ

* Пациенти:

Хоспитални (КАРИЛ, онкологија, кардиохирургија, ОРЛ)

Бактериски култури:

- „**чисти**„
- колонии во **помал број**

- „**мешани**„
- пр. со дифтероиди

- *Staphylococcus aureus* **MSSA**
- *Staphylococcus aureus* **MRSA**

осетливост на
мупиоцин

- Микроорганизмот може да е дел од **нормалната назофарингеална флора**; во отсуство на клинички параметри за инфекција **терапија не се препорачува.**

- Препорака за користење на мупироцин: само ако микроорганизмот има епидемиолошко значење (пр. вработени во прехранбена или фармацевтска индустрија, КАРИЛ, имунокомпромитирани, пациенти на дијализа..)

Брис од **нос**: РЕЗУЛТАТИ

Амбулантски

САМО „чисти „култури

- *Staphylococcus aureus* **MSSA**
- *Staphylococcus aureus* **MRSA**

осетливост на
мупиоцин

- Микроорганизмот може да е дел од **нормалната назофарингеална флора**; во отсуство на клинички параметри за инфекција терапија не се препорачува.
- Препорака за користење на мупиоцин: само ако микроорганизмот има епидемиолошко значење (пр. вработени во прехранбена или фармацевтска индустрија, КАРИЛ, имунокомпромитирани, пациенти на дијализа..)

Брис од **НОС**: РЕЗУЛТАТИ

- . *Streptococcus pneumoniae*
- . *Haemophilus influenzae*
- . *Streptococcus pyogenes*
- . *Moraxella catarrhalis*



Можни предизвикувачи на заболувања, но и ..

- **НОСИТЕЛСТВО**
- **КОЛОНИЗАЦИЈА**
- **КОНТАМИНАЦИЈА**

МИКРОБИОЛОШКА ДИЈАГНОЗА НА ИНФЕКЦИИ НА ДОЛНИ ДИШНИ ПАТИШТА

- **Конвенционални** микробиолошки испитувања: **дискутабилни !**
- **Клинички: правилна анатомска локализација на инфекција**
(пр. акутен бронхит, акутна егзацербација на хроничен бронхит, пневмонија стекната во заедницата, нозоконијална пневмонија..)
- **Примероци :**
 - **спутум** (возрасни) ; **контаминиран со плунка** (орофарингеална флора)
 - **трахеален аспират** (деца)
 - **бронхоалвеоларен лават** (БАЛ)
 - **назофарингеален испирок...**

СПУТУМ

- **Контаминиран со плунка (орофарингеална флора)**
(не мора да е поврзана со етиолошки причинител на инфекција; патогени бактерии прекриени со физиолошка флора или слуз)
- **Адекватен примерок !**
- **Препарат по Грам** (пред културелно испитување !!!)
 - иницијален дијагностички тест
 - скринирање на квалитет на примерок
(леукоцити, скавамозни епителни клетки, микроорганизми)
 - иницијална терапија
 - интерпретација на примарни бактериски култури

Грам препарат: **стандардни ГРЕШКИ** при квантитативно толкување

Мала:

- да се соопштат **полиморфонуклеари**, а **HE** се присутни

Поголема:

- да се соопшти **микроорганизам**, а **HE** е присутен;
- да **HE** се соопштат **полиморфонуклеари** (+1 или +2)

Голема:

. ако **HE** се соопшти присуство на **микроорганизам**;
. ако **HE** се соопшти присуство на **полиморфонуклеари** се
>10x (**+3 или +4**) во однос на епителни клетки

Секогаш се соопшуваат

Streptococcus pyogenes
Group B streptococci in pediatric population
Francisella tularensis
Bordetella spp., especially *Bordetella bronchiseptica*
Yersinia pestis
Nocardia spp.
Bacillus anthracis
Cryptococcus neoformans
Molds, not considered saprophytic contaminants
Neisseria gonorrhoeae

Секогаш се соопштуваат (присутни во мал број (+, 1) и се гледаат во препарат)

Streptococcus pneumoniae
Hemophilus influenzae (beta-lactamase +/-)

Се соопштуваат - (++; 2)

Moraxella catarrhalis
Neisseria meningitidis
nosocomial infections:
Pseudomonas aeruginosa
Stenotrophomonas maltophilia
Acinetobacter spp.
Burkholderia spp.

Се соопштуваат - (++; 2)

Staphylococcus aureus
Beta-hemolytic streptococcus B (adults), C, or G
Gram-negative rod (especially *Klebsiella pneumoniae*)
Fastidious gram-negative rods; usually report beta-lactamase
Corynebacterium spp. if urea positive or from ICU
Rhodococcus equi in immunocompromised patients

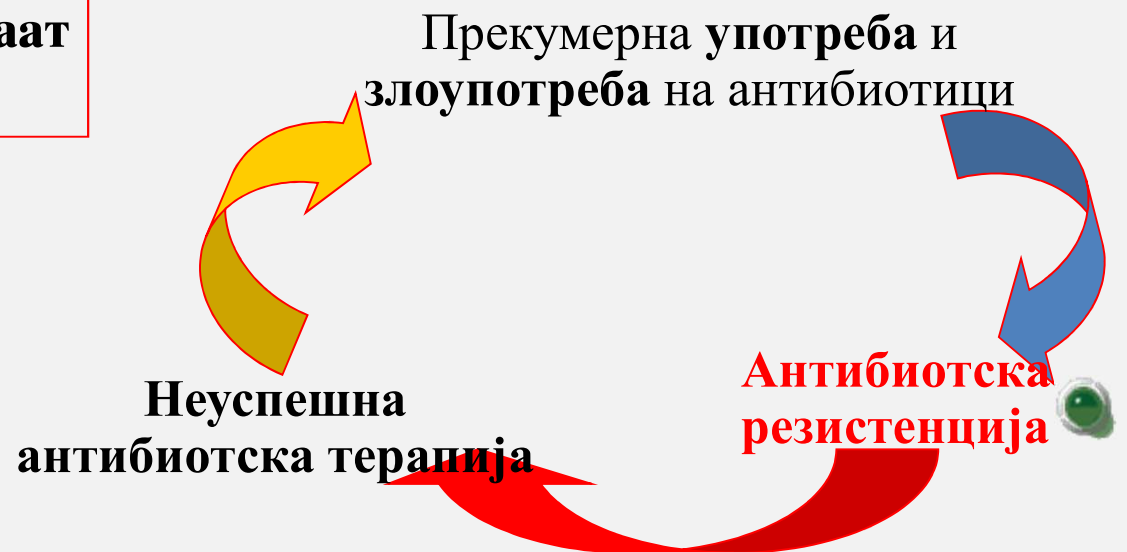
АРИ: злоупотреба на антибиотици

90% ВИРУСНИ причинители

STOP

70 - 80%

од болни при прв преглед добиваат **антибиотик!**



АНТИБИОТИК !

НЕ Е...!

- **АНТИВИРУСЕН ЛЕК**
- **АНАЛГЕТИК**
- **АНТИПИРЕТИК**
- **СЕДАТИФ**

АНТИБИОТИК !

НЕ ...!

- **делува на сите бактерии,**
- резистентни бактерии,**
- мултирезистенција**

**ИЗБОР НА НАЈДОБАР
АНТИБИОТИК
СО АДЕКВАТНА ДОЗА
ЗА ОДРЕДЕН ПАЦИЕНТ**

**Микробиолог: МИК на антибиотик за одреден
изолат на бактерија**

**Фармацевт: фармаколошки параметри за
антибиотик (пр. време на елиминација)**

**ЛЕКАР: правилна дијагноза и согледување на
сите фактори на ризик кај пациентот**

