



Univerza v Ljubljani | Medicinska fakulteta
INŠTITUT ZA MIKROBIOLOGIJO IN IMUNOLOGIJO



Sekcija za klinično mikrobiologijo
in bolnišnične okužbe

10. Likarjev simpozij

Odvzem in transport vzorcev za mikrobiološke preiskave



16. in 17. junij 2021
Zbornik predavanj

10. Likarjev simpozij

Odvzem in transport vzorcev
za mikrobiološke preiskave



Univerza v Ljubljani | Medicinska fakulteta
INŠTITUT ZA MIKROBIOLOGIJO IN IMUNOLOGIJO



Sekcija za klinično mikrobiologijo
in bolnišnične okužbe

Spletni simpozij, 16. in 17. junij 2021
Zbornik predavanj z recenzijo

10. LIKARJEV SIMPOZIJ ODVZEM IN TRANSPORT VZORCEV ZA MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE

16. in 17. junija 2021

Spetni simpozij

Zbornik predavanj z recenzijo

UREDNIKA

izr. prof. dr. Tadeja Matos, dr. med.

ORGANIZATORJA

Sekcija za klinično mikrobiologijo

in bolnišnične okužbe SZD

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani

<https://imi.si>

ORGANIZACIJSKI ODBOR

izr. prof. dr. Tadeja Matos, dr. med.

doc. dr. Mateja Pirš, dr. med.

doc. dr. Polona Maver Vodičar, dr. med.

prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.

asist. dr. Andrej Golle, dr. med.

Helena Ribič, dr. med.

Barbara Zdolšek, dr. med.

RECENZENTI

Eva Kotnik, dr. med.

mag. Veronika Križan Hergouth, dr. med.

doc. dr. Polona Maver Vodičar, dr. med.

prof. dr. Eva Ružič Sabljic, dr. med.

Mateja Škamperle, dr. med.

dr. Nataša Švent Kučina, dr. med.

Barbara Zdolšek, dr. med.

LEKTORICA ZA SLOVENSKI JEZIK

Bojana Maltarič, prof. slov.

IZDALA

Sekcija za klinično mikrobiologijo

in bolnišnične okužbe SZD, Ljubljana, 2024

PRELOM

Boex DTP, d. o. o.

FOTOGRAFIJA NA NASLOVNICI

Marko Kolenc, Inštitut za mikrobiologijo

in imunologijo MF UL

Vsebina

Splošna načela odvzema vzorcev za mikrobiološke preiskave <i>Veronika Križan-Hergouth, Barbara Zdolšek</i>	5
Transport vzorcev za mikrobiološko preiskavo <i>Nataša Berginc, Helena Ribič, Veronika Križan-Hergouth</i>	11
Elektronsko naročanje mikrobioloških preiskav <i>Alenka Štorman, Daša Kavka, Tina Triglav</i>	19
Odvzem hemokultur <i>Kristina Nadrah, Jolanda Munih</i>	25
Likvor za mikrobiološke preiskave <i>Kristina Fujs Komloš, Natalija Planinc Strunjaš, Ivana Velimirovič</i>	29
Kaj moramo vedeti, preden pošljemo vzorec za molekularno mikrobiološko preiskavo <i>Vesna Cvitković Špik, Tjaša Cerar Kišek, Katja Strašek Smrdel, Tina Triglav, Eva Ružič Sabljic</i>	37
Odvzem kužnin pri okužbah v oftalmologiji <i>Petra Schollmayer, Ivana Velimirovič, Katja Matovič, Tina Triglav, Xhevat Lumi, Nataša Vidović Valentinčič, Zala Lužnik Marzidovšek</i>	49
Nadzorne kužnine za presejanje na večkratno odporne bakterije <i>Mateja Pirš, Tatjana Mrvič, Lea Knez, Urška Kramar</i>	57
Žilni katetri, črpalke, vsadki in drugi umetni materiali: odvzem vzorcev za mikrobiološko preiskavo <i>Milena Kerin Povšič</i>	65
Odvzem kužnin pri okužbah v ortopediji <i>Mitja Rak, Samo Jeverica</i>	75
Odvzem kužnin pri okužbah kože in ran <i>Andrej Kraševac Glaser, Polona Maver Vodičar, Vesna Breznik, Maja Bombek Ihan</i>	81
Odvzem in transport vzorcev za mikrobiološke preiskave pri okužbah spodnjih dihal <i>Julija Germ, Katja Seme</i>	87

Posebnosti odvzema in transporta vzorcev za parazitološke preiskave <i>Urška Glinšek Biškup, Barbara Šoba Šparl</i>	97
Odvzem in transport vzorcev urina za mikrobiološke preiskave <i>Urška Kramar, Helena Ribič</i>	105

Veronika Križan-Hergouth,¹ Barbara Zdolšek²

Splošna načela odvzema vzorcev za mikrobiološke preiskave

General Principles of Specimen Collection in Microbiology

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: kakovost vzorcev, splošna navodila, varnost, izobraževanje

Odvzem vzorcev je pomemben del mikrobiološke preiskave. Nepravilnosti pri odvzemu neposredno vplivajo na kakovost in zanesljivost rezultatov izvedenih preiskav. Osebe, ki opravljajo odvzeme, se morajo zavedati pomena dobrega odvzema in svoje soodgovornosti za izid mikrobiološke preiskave. Upoštevati morajo navodila, ki jih pripravi mikrobiološki laboratorij. Pri tem so pomembni poznavanje splošnih načel odvzema vzorcev, ustrezna usposobljenost in uporaba zaščitnih sredstev. Za kakovostno mikrobiološko preiskavo je nujno dobro sodelovanje med laboratorijem in zdravstvenimi ustanovami, kjer vzorce odzemajo.

ABSTRACT

KEY WORDS: specimen quality, general recommendations, safety, education

The collection of samples is an important part of microbiological testing. Irregularities during sample collection directly impact the quality and reliability of the test results. Persons performing sample collection must be aware of the significance of proper collection and their shared responsibility for the outcome of microbiological tests. They should adhere to the instructions provided by the microbiological laboratory. Key factors include understanding general principles of sample collection, appropriate training, and the use of protective measures. To insure high-quality microbiological examination, effective collaboration between laboratories and healthcare institutions involved in sample collection is essential.

¹ Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana. Korespondenca/correspondence: veronika.krizan-hergouth@mf.uni-lj.si

² Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska 1, 2000 Maribor; barbara.zdolsek@nlzoh.si

UVOD

Odvzem vzorcev je pomemben del mikrobiološke preiskave. Sodi v predanalizno fazo, ki se začne z naročilom mikrobiološke preiskave, identifikacijo in pripravo bolnika, nadaljuje se z odvzemom vzorca in prenosom v mikrobiološki laboratorij ter se zaključi s sprejemom v laboratoriju, kjer poteka analizna faza (1).

Za kakovostno mikrobiološko preiskavo je najpomembnejši dober vzorec. Pravilno ravnanje z vzorci pri odvzemu in transportu je odločilno za klinično relevantne rezultate preiskav. Neustrezen odvzem vpliva na potek preiskave. Posledice nepravilnosti so med drugim zamude pri sporočanju rezultatov, nepotrebne ponovitve testiranja ter nepravilni rezultati, ki lahko pomembno vplivajo na terapevtske odločitve in potek zdravljenja bolnikov (2).

Odvzem vzorcev praviloma ne poteka v mikrobiološkem laboratoriju, ampak v bolnišnicah in drugih zdravstvenih ustanovah, zato je medsebojno sodelovanje zelo pomembno. Naloga mikrobiološkega laboratorija je priprava navodil za odvzem vzorcev, ki morajo vsebovati natančne podatke o načinu odvzema za posamezne vrste vzorcev in preiskav (mesto odvzema, postopek odvzema, količina vzorca, embalaža za shranjevanje, pogoji hranjenja in transporta). Naloga oseb, ki opravljajo odvzem – večinoma so to medicinske sestre ali zdravniki – pa je, da navodila vključijo v svoje delovne protokole in jih upoštevajo. Zelo pomembno je, da se vsi deležniki v procesu zavedajo pomena kakovostnega odvzema, sicer mikrobiološki laboratorij ne more v polni meri prispevati k obravnavi in zdravljenju bolnikov (3).

Za kakovosten odvzem je treba slediti splošnim načelom za odvzem vzorcev. Ta vključujejo način odvzema (izbor in pravilna tehnika), čas odvzema, varnost in zaščito oseb, ki vzorce jemljejo, ter njihovo usposobljenost za to delo. (4).

NAČIN ODVZEMA VZORCA

- 1. Vzorce moramo odvzeti z anatomskega mesta, kjer je verjetnost, da bomo povzročitelja bolezni našli, največja.** Odvzem reprezentativnega vzorca pri nekaterih okužbah ni preprost in se pogosto nadomesti z lažje dostopnimi odvzemi. Med pogostejšimi primeri nepravilnih odvzemov so vzorci pri okužbah srednjega ušesa, kjer najustreznejši vzorec, to je tekočina iz srednjega ušesa, odvzeta s punkcijo, nadomestimo z brisom zunanjega sluhovoda, ter vzorci pri vnetju obnosnih votlin, kjer aspirat sinusa nadomestimo z neustreznim brisom nosu. Ker izolirani mikroorganizmi v takih primerih zelo verjetno niso dejanski povzročitelji, je rezultat mikrobiološke preiskave nepravilen in lahko vodi v neustrezno obravnavo bolnika (4, 5).
- 2. Vzorce odvezamo z aseptično tehniko na pravilen način z ustreznimi postopki in pripomočki v skladu z navodili mikrobiološkega laboratorija.** Zelo pogosta dilema pri odvzemu vzorcev ran je odvzem z brisom ali s punkcijo oziroma z biopsijo. Odvzem z brisom je razmeroma preprost in poceni, vendar je količina odvzetega vzorca praviloma manjša kot pri punktatih ali biopsijah, pogostejše so kontaminacije z normalno mikrofloro, določene vrste brisov pa imajo lahko tudi toksičen učinek na nekatere mikroorganizme v vzorcu (4, 5).
- 3. Pri odvzemu moramo v največji možni meri preprečiti kontaminacijo z normalno mikrofloro.** Pri odvzemu vzorcev, kjer so tudi bakterije normalne mikroflore lahko povzročiteljice okužb (kri za hemokulture, različni punktati, tkiva), je ključna ustrezna priprava odvzemnega mesta. Za preprečevanje kontaminacij s kožno mikrofloro moramo uporabiti učinkovita razkužila in ustrezno izpeljati postopek razkuževanja. Pri nekaterih vzorcih, denimo iz spodnjih dihalnih

poti, brisi površinskih ran ali urin, pa je pomembno, da uporabimo pravilno tehniko odvzema, s čimer zmanjšamo kontaminacijo z normalno mikrofloro in tako omogočimo rast pravih povzročiteljev okužb (3, 4, 5).

4. **Odvzeti moramo zadostno količino vzorca.** Če je količina vzorca premajhna, so lahko rezultati preiskave lažno negativni (3). Večji volumen odvzetega vzorca praviloma povečuje verjetnost detekcije mikroorganizmov. Cockerill s sodelavci je v študiji ugotovil, da se število izoliranih mikroorganizmov iz hemokultur povečuje sorazmerno z volumnom odvzete krvi (6). Če želimo naročiti več preiskav, je treba odvzeti ustrezno večji volumen vzorca ali večje število vzorcev (4).
5. **Za odvzem moramo uporabiti ustrezno embalažo.** Izbor embalaže (posodice, lončki, brisi) je odvisen od vrste vzorca, načina odvzema in transporta ter predvidene preiskave. Pomembno je, da je embalaža za odvzem sterilna, nepoškodovana in da dobro tesni. Uporabiti moramo embalažo, ki jo predpisujejo mikrobiološki laboratoriji. Zelo pomembno je, da uporabimo ustrežna transportna gojišča za načrtovano preiskavo (npr. pri preiskavah na viruse in atipične bakterije), sicer želenih preiskav ni mogoče izpeljati (5).
6. **Vzorci morajo biti ustrezno označeni, spremljati jih mora pripadajoča spremena dokumentacija.** Vsebovati morajo podatke, ki omogočajo nedvoumno identifikacijo vzorca in bolnika. Pomembno je, da so podatki na vzorcu in v spremni dokumentaciji identični.

Na embalaži (brisi, posodice, epruvete) morajo biti podatki o bolniku, ki zagotavljajo njegovo identifikacijo, ter podatki o vzorcu v obsegu, ki je potreben (vrsta vzorca, mesto odvzema, ura odvzema).

Spremna dokumentacija v tiskani ali elektronski obliki mora vsebovati ključne informacije o bolniku in vzorcu:

- osnovni osebni podatki bolnika (ime in priimek, datum rojstva, spol, naslov, KZZ – kartica zdravstvenega zavarovanja ali EMŠO – enotna matična številka občana),
- podatki o pošiljatelju (ustanova, oddelek, telefonska številka),
- vrsta vzorca (z mestom odvzema, ko je to potrebno),
- datum in ura odvzema,
- vrsta preiskave.

Za kakovostno interpretacijo in natančnost rezultatov pa so pomembni še dodatni podatki:

- klinična diagnoza ali klinični simptomi,
- pomembni podatki o bolniku (npr. tedni nosečnosti, presaditev),
- podatki o potovanjih in drugi pomembni epidemiološki podatki,
- sum na okužbo z določenimi mikroorganizmi,
- podatki o antibiotični terapiji (3, 4, 5).

ČAS ODVZEMA VZORCA

Vzorec je treba odvzeti čim hitreje po začetku okužbe, optimalni čas odvzema pa mora temeljiti na tipu vnetnega procesa oziroma vrsti vzorca, ki ga bomo odvzeli. Pri nekaterih okužbah je tako boljši prvi jutranji vzorec (na primer sputum in urin za mikobakterije), ker je količina mikroorganizmov v vzorcu takrat praviloma višja. Za detekcijo intermitentne bakteriemije je optimalen odvzem dveh setov hemokulturnih stekleničk z različnih odvzemnih mest v času naraščanja telesne temperature, medtem ko pri kontinuirani bakteriemiji odvzemni čas ni tako pomemben (7). Pri bolnikih s trajnim urinskim katetrom je treba urin za urinokulturo odvzeti po menjavi katetra, in ne pred njo, saj so lahko rezultati vzorca, odvzetega pred menjavo, lažno pozitivni in zavajajoči (8).

Odvzem vzorcev vedno opravimo pred uvedbo antibiotičnega zdravljenja, če je to seveda izvedljivo. To je eno najpomembnejših pravil, ki ga moramo upoštevati predvsem pri odvzemu vzorcev za klasične bakteriološke preiskave. Uvedba antibiotika namreč pomembno vpliva na rast bakterij iz odvzetega vzorca. Če hemokulture odvezamo med antibiotičnim zdravljenjem, je detekcija povzročiteljev bistveno nižja (9).

Pomembno je, da odvzem vzorcev optimiziramo tudi glede na čas delovanja mikrobiološkega laboratorija. Najbolje je, da vzorce odvezamo in dostavimo v času rednega dela laboratorijev; to je večinoma v dopoldanskem času, ker so takrat laboratoriji praviloma kadrovsko bolj zasedeni in lahko postopke izvedejo hitreje. Odvzem v dopoldanskem času je zelo pomemben v bakteriologiji, saj je pri kultivaciji na gojišča v dopoldanskem času verjetnost za dostne rasti mikroorganizmov v naslednjem dnevu večja (7).

Ura odvzema vzorca je podatek, ki mora biti v spremni dokumentaciji obvezno naveden.

VARNOST PRI ODVZEMU VZORCA

Osebe, ki odvezajo vzorce za mikrobiološke preiskave, za zaščito uporabijo standardno osebno varovalno opremo (zaščitna delovna obleka, rokavice in kirurška maska). Dodatna zaščitna sredstva so potrebna na primer pri odvzemu vzorcev iz dihal za preiskavo na virus SARS-CoV-2 ali druge respiratorne viruse. Vključujejo zaščito oči z očali ali vizirjem, zaščitno obleko ter maske oziroma respiratorje, ki zagotavljajo višjo stopnjo zaščite (FFP2/N95 ali FFP3/N99) (10, 11). Najvišja stopnja osebne varovalne opreme pa je potrebna pri odvzemu vzorcev bolnikov s sumom na okužbo ali z okužbo z visokokužnimi mikroorganizmi. Takrat uporabimo še zašči-

tni predpasnik, zaščitno obutev ter popolno zaščito obraza in lasišča (12).

Zelo pomembno je, da je varovalna oprema nepoškodovana in ustrezne kakovosti ter da jo uporabljamo na pravilen način. Predvsem pri višjih stopnjah zaščite moramo zelo natančno poznati in dosledno upoštevati postopke za oblačenje, uporabo in odstranjevanje zaščitne opreme (12).

Zaščitna oprema, ki jo uporabijo osebe pri odvzemu, je razen za lastno zaščito pomembna tudi zaradi preprečevanja kontaminacij vzorcev pri odvzemu. Sanders s sodelavci je v študiji dokazala zmanjšan delež kontaminacij hemokultur po uvedbi obveznega nošenja maske in zaščite lasišča pri odvzemu krvi za hemokulture, in sicer z 2,8 na 1,1 % (13).

USPOSABLJENOST OSEB, KI ODVZEMAJO VZORCE

Osebe, ki odvezajo vzorce za mikrobiološke preiskave, morajo biti ustrezno usposobljene. Izobraževanje je zelo pomembno in mora potekati stalno. Kakovost odvzetih vzorcev je večja, če odvzem izvajajo za delo dobro usposobljene ekipe. V študiji, ki jo je izvedel Bae s sodelavci, je bil delež kontaminacij hemokultur v skupini, ki je bila deležna intenzivnega izobraževanja in je izvajala izključno odvzeme krvi, bistveno nižji kot v skupini pripravnikov, ki niso imeli obsežnega usposabljanja in so opravljali še številna druga dela. V prvi skupini so bili ustrežnejši tudi volumni odvzete krvi, prav tako je bil višji delež pravih pozitivnih hemokultur (14).

Pomembno je tudi, da imajo osebe, ki vzorce odvezajo, na voljo ustrezna navodila, ki jih morajo natančno upoštevati. Zavedati se morajo, da s svojim delom vplivajo na kakovost vzorcev in da so soodgovorne za izid mikrobiološke preiskave (3).

KRITERIJI ZA ZAVRNITEV VZORCA

Vsak mikrobiološki laboratorij mora opredeliti kriterije nesprejemljivosti vzorcev, ki morajo biti dostopni naročnikom preiskav. Odvzet vzorec je praviloma enkraten. Če je le mogoče, napake, ugotovljene ob sprejemu v laboratorij, odpravimo s telefonsko komunikacijo. Če to ni izvedljivo in je vzorec zavrjen, mora laboratorij o tem obvestiti naročnika.

Razlog za zavrnitev je lahko administrativna napaka ali napake vzorca. Vzorec zavrnemo, ko identifikacija vzorca ali bolnika ni mogoča, če vzorec ni primeren za zahtevano preiskavo, če je poslan v neprimerni embalaži ali v neustreznem transportnem gojišču in seveda v primeru, ko laboratorij zahtevane preiskave ne izvaja.

Med najpogostejše napake pri odvzemu sodijo vzorci, poslani v neustreznem transportnem gojišču za izbrano preiskavo, nezadostna količina vzorca, razlit

ci in administrativne napake, ki onemogočajo identifikacijo vzorca oziroma bolnika (3, 4, 5).

ZAKLJUČEK

Odvzem vzorcev je del mikrobiološke preiskave. Rezultati preiskav so lahko natančni in zanesljivi samo, če odvzem in prenos vzorcev v laboratorij opravimo na pravi način. Priprava navodil je naloga mikrobiološkega laboratorija. Osebe, ki izvajajo odvzeme, morajo poznati postopke in upoštevati navodila za odvzem. Zavedati se morajo svoje soodgovornosti za izid mikrobiološke preiskave. Pri tem so pomembni poznavanje splošnih načel odvzema vzorcev, ustrezna usposobljenost in uporaba zaščitnih sredstev. Za kakovostno mikrobiološko preiskavo je nujno dobro sodelovanje med laboratorijem in zdravstvenimi ustanovami, kjer vzorce odvzemajo.

LITERATURA

1. International Organization for Standardization. ISO15189:2012: medical laboratories: particular requirements for quality and competence. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2012.
2. Plebani M. The Detection and Prevention of Errors in Laboratory Medicine. *Ann Clin Biochem.* 2010;47:101–110.
3. Miller JM, Krisher K, Holmes HT. General Principles of Specimen Collection and Handling. In: Murray PR, ed. *Manual of Clinical Microbiology.* 9th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2007. p. 43–54.
4. Wilson ML. General Principles of Specimen Collection and Transport. *Clin Infect Dis.* 1996;22:766–777.
5. Miller JM, Miller SA. Section I Communicating Laboratory Needs. In: Miller JM, Miller SA. *A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology.* 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2017. p. 3–40.
6. Cockerill FR, Wilson JW, Vetter EA, et al. Optimal Testing Parameters for Blood Cultures. *Clin Infect Dis.* 2004;38:1724–1730.
7. Miller JM, Miller SA. Section II Specimen Management Policies and Rationale. In: Miller JM, Miller SA. *A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology.* 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2017. p. 41–64.
8. Batura D, Rao GG, Foran M, et al. Changes observed in urine microbiology following replacement of longterm urinary catheters: need to modify UTI guidelines in the UK? *Int Urol Nephrol.* 2018;50:25–28.
9. Scheer CS, Fuchs C, Gruendling M, et al. Impact of antibiotic administration on blood culture positivity at beginning of sepsis: a prospective clinical cohort study. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25:326–331.
10. World Health Organisation. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Geneva: World Health Organisation; 2020 [cited 2021 Oct 1]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501>.
11. Ippolito M, Vitale F, Accurso G, et al. Medical masks and Respirators for the Protection of Healthcare Workers from SARS-CoV-2 and other viruses. *Pulmonol.* 2020;26(4):204–212.
12. World Health Organisation. How to safely collect oral swabs (saliva) from deceased

patients suspected to be infected with Ebola or Marburg. Geneva: World Health Organisation; 2017 [cited 2021 Oct 1]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/how-to-safely-collect-oral-swabs-from-deceased-patients-suspected-to-be-infected-with-ebola-or-marburg>.

13. Sanders A, Agger WA, Gray AM, et al. Use of Hair Nets and Face Masks to decrease Blood Culture Contamination rates. *Diag Microbiol and Infect Dis*. 2019;95:15–19.
14. Bae M, Kim HI, Park JH, et al. Improvement of Blood Culture Contamination Rate, Blood Volume, and True Positive Rate after Introducing a Dedicated Phlebotomy Team. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38:325–330.

Nataša Berginc,¹ Helena Ribič,² Veronika Križan-Hergouth³

Transport vzorcev za mikrobiološko preiskavo

Transport of specimens for microbiological investigations

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: mikrobiološka preiskava, vzorec, transport, prenos, integriteta vzorca, varnost prenosa

Vzorke za mikrobiološko preiskavo je, razen v primeru testiranja ob bolniku, treba prenesti s točke odvzema na točko testiranja. Transport vzorcev je kompleksen predanalizni postopek, ki nepovratno vpliva na kakovost vzorca, s tem pa na mikrobiološko preiskavo in njene rezultate, ki so odločilni za klinično obravnavo bolnika in sprejem javnozdravstvenih ukrepov za obvladovanje nalezljivih bolezni. Pred in med transportom je treba zagotoviti ohranitev integritete vzorca ter varnost oseb in okolja. Dolžnost mikrobiološkega laboratorija je, da v navodilih definira pogoje in načine za transport vseh vrst vzorcev za mikrobiološke preiskave, ki jih izvaja. Nujno je kontinuirano spremljanje smernic in skladno posodabljanje postopkov oziroma navodil. Prizadevati si je treba za čim večjo standardizacijo postopkov. Prav tako nujno je stalno izobraževanje vseh delavcev, ki sodelujejo pri transportu vzorcev, da lahko zagotovimo pravilno in varno izvajanje vseh postopkov.

ABSTRACT

KEY WORDS: microbiological investigation, specimen, transport, specimen integrity, safety of transportation

Except in case of near-patient microbiological testing, specimens collected for microbiological investigations have to be transported from the collection site to the testing site. Specimen transport is a complex pre-analytical step with irreversible effects on specimen quality: it determines the microbiological investigation, its results and consequences, such as clinical patient management and implementation of public health measures for infectious disease control. During specimen transport, the preservation of specimen integrity as well as the safety of personnel and the environment are vital. The microbiological laboratory performing microbiological investigations should provide a set of guidelines to determine appropriate transport conditions and modes. These gu-

¹ Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano (NLZOH), Center za medicinsko mikrobiologijo, Bohoričeva ulica 15, 1000 Ljubljana. Korespondenca/correspondence: natasa.berginc@nlzoh.si

² Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano (NLZOH), Center za medicinsko mikrobiologijo, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

³ Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

idelines have to be continuously monitored and updated. Standardisation of guidelines is also highly desirable. Continuous education of professionals involved in the process of specimen transportation is key for correct and safe performance of all related procedures.

UVOD

Predanalizna faza vključuje vse postopke, ki potekajo pred izvedbo mikrobiološke preiskave (1). Ključno vpliva na kakovost vzorca in posledično na rezultate mikrobiološke preiskave, ki so odločilni za klinično obravnavo bolnika in sprejem javnozdravstvenih ukrepov za obvladovanje nalezljivih bolezni (1, 2, 3). Predanalizna faza poteka pretežno zunaj mikrobiološkega laboratorija, pri izvedbi pa sodelujejo različni zdravstveni in nezdravstveni delavci (zdravniki, zdravstveni tehniki in medicinske sestre, laboratorijski delavci, kurirji idr.), zato je predanalizne postopke težko nadzorovati (3). Da zagotovi čim bolj kakovosten vzorec za mikrobiološko preiskavo, mora mikrobiološki laboratorij pripraviti navodila za ustrezno in kar najbolj standardizirano izvedbo postopkov v predanalizni fazi (2).

Vzorci za mikrobiološko preiskavo je, razen v primeru testiranja ob bolniku, treba prenesti s točke odvzema na točko testiranja. Transport vzorcev je kompleksen predanalizni postopek, ki nepovratno vpliva na kakovost vzorca, s tem pa na mikrobiološko preiskavo, njene rezultate in posledice (4).

TRANSPORT VZORCEV ZA MIKROBIOLOŠKO PREISKAVO

Transport vzorca je premik vzorca z ene točke na drugo, najpogosteje z mesta odvzema na mesto testiranja (5). Med transportom je treba zagotoviti ohranitev integritete vzorca (to pomeni, da vzorec ohrani lastnosti, ki so čim bolj podobne lastnostim v trenutku odvzema) ter varnost oseb in okolja (torej preprečiti okuž-

be in kontaminacijo okolja, ki bi lahko bila vir okužb) (1).

Dolžnost mikrobiološkega laboratorija je, da v navodilih definira pogoje in načine za prenos vseh vrst vzorcev za preiskave, ki jih izvaja. Navodila, ki so sestavni del sistema kakovosti mikrobiološkega laboratorija, morajo biti izdelana na podlagi veljavnih strokovnih in varnostnih predpisov, strokovnih nacionalnih in mednarodnih standardov, strokovnih priporočil ter ob upoštevanju načel dobre laboratorijske prakse in specifičnih izkušenj. Ena od osnovnih podlag za izdelavo tovrstnih navodil je standard ISO 20658:2017, Requirements for Collection, Transport, Receipt and Handling of Samples (6). Mikrobiološki laboratorij mora zagotoviti, da so navodila javno dostopna uporabnikom (na spletni strani ali v tiskanih publikacijah). Poleg tega morajo biti javno dostopni kontaktni podatki (telefonske številke, kontaktne osebe), kjer uporabniki lahko pridobijo dodatne informacije in pojasnila.

POGOJI ZA TRANSPORT VZORCEV ZA MIKROBIOLOŠKO PREISKAVO

Vzorec za mikrobiološko preiskavo od odvzema do začetka testiranja hranimo v transportnem sistemu. Sestavljajo ga primarna posodica (epruveta, posodica za urin, blato ali sputum idr.), ki po potrebi vsebuje transportno gojišče (tekoče ali poltrdo gojišče za konzervacijo vzorca), lahko tudi še pripomoček, s katerim je bil vzorec odvzet (bris, spatula idr.). Mora biti ustrezne vrste glede na vzorec in preiskavo ter glede na pogoje in način transporta (na primer bris nazofarinksa za detek-

cijo virusov s PCR se prenaša v mediju za viruse, bris nazofarinksa, ki ga bomo uporabili za kultivacijo bakterij, pa v gojišču za bakterije, kot je gojišče po Stuartu ali po Amiesu). Prav tako mora biti neprepusten in nepoškodovan. Transportni sistem zagotavlja ohranjanje integritete vzorca ter varnost oseb in okolja pri ravnanju z vzorcem med transportom (5). Zahteve glede kakovosti transportnih sistemov v Evropi določata dve direktivi, Direktiva 93/42/EGS o medicinskih pripomočkih in Direktiva 98/79/EGS o in vitro diagnostičnih medicinskih pripomočkih (5, 7, 8). Kakovost transportnega sistema mora zagotoviti proizvajalec in jo izkazati s certifikati. V določenih primerih lahko kakovost dodatno preveri še mikrobiološki laboratorij, na primer za mikroorganizme, zelo občutljive za zunanje pogoje, ali če spremeni transportne pogoje, ki jih navaja proizvajalec (5).

Transportni čas vzorca je čas, ki preteče od trenutka odvzema vzorca do testiranja vzorca. Zajema čas shranjevanja vzorca od trenutka odvzema do transporta (čakanje na transport), transport in čas shranjevanja vzorca od sprejema v mikrobiološki laboratorij do testiranja (čakanje na testiranje) (5).

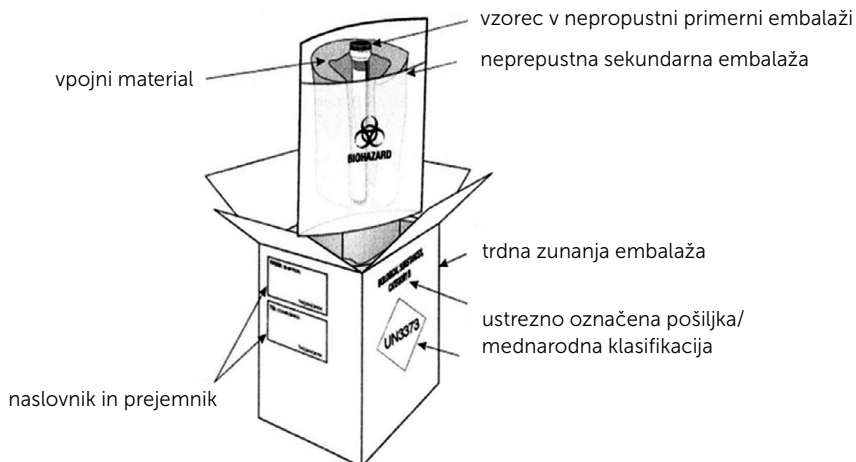
Transportna temperatura vzorca je temperatura, pri kateri poteka prenos vzorca z ene točke na drugo. Določi jo mikrobiološki laboratorij tako, da sta zagotovljeni ohranitev integritete vzorca in viabilnost mikroorganizmov v vzorcu (5).

Pogoji transporta so odvisni od vrste mikrobiološke preiskave, ki jo bomo opravili na vzorcu, in od lastnosti mikroorganizmov, ki jih bomo določali. Zato so specifični za določene skupine preiskav in določene skupine mikroorganizmov (9). Mikrobiološki laboratorij v navodilih za vse vrste vzorcev definira transportni sistem ter kombinacijo transportne temperature in transportnega časa, ki omogoča ohranitev integritete vzorca med transportom (9).

V zvezi s transportnim sistemom navodilo definira vrsto sterilne primarne posodice in transportnega gojišča ter minimalno količino vzorca, ki je potrebna za mikrobiološko preiskavo. V zvezi s transportnim časom se definira maksimalni čas od odvzema vzorca do transporta (čakanje na transport), optimalni čas transporta (najbolje v čim krajšem možnem času po odvzemu vzorca) in maksimalni čas transporta (največji časovni interval, ki poteče od trenutka odvzema do začetka testiranja, ko še lahko zagotovimo, da je vzorec primeren za mikrobiološko preiskavo). V zvezi s transportno temperaturo navodilo določa temperaturo za shranjevanje vzorca od trenutka odvzema do transporta in temperaturo za transport vzorca. Najbolje je, da sta ti temperaturi enaki (4).

SISTEM TROJNEGA PAKIRANJA VZORCEV ZA TRANSPORT

Vzorce za transport pripravimo po sistemu trojnega pakiranja, ki ga sestavljajo primarna, sekundarna in zunanja embalaža. Primarna embalaža je transportni sistem (definiran v poglavju *Pogoji za transport vzorcev za mikrobiološko preiskavo*), ki mora biti neprepusten in nepoškodovan. Sekundarna embalaža mora biti prav tako neprepustna, vsebuje pa vzorec v primarni embalaži in dovolj vpojnega materiala, da vpije celotno vsebino vzorca, če bi primarna embalaža vendarle puščala. Zunanja embalaža je pogosto trdna kartonasta ali druga trdna embalaža, ki ščiti primarno in sekundarno embalažo (Slika 1). Dokumentacija, ki jo pošiljamo skupaj z vzorci, mora biti vedno ločena od vzorcev, da se ob morebitnem razlitju vzorca dokumenti ne bi kontaminirali s kužnino (na primer v ločenih plastičnih ovojnicah) (2, 10).



Slika 1: Priprava vzorca za transport – sistem trojnega pakiranja.

NAČINI TRANSPORTA VZORCEV ZA MIKROBIOLOŠKO PREISKAVO

Transport vzorcev na krajše razdalje, znotraj iste ali med bližnjimi lokacijami, najpogosteje opravljajo kurirji, lahko pa uporabimo zračni cevni transportni sistem, če je na voljo. Transport vzorcev na daljše razdalje, v notranjem ali mednarodnem prometu, običajno poteka po pošti ali prek komercialnih pooblaščenih kurirskih služb (na primer DHL, UPS, World Courier idr.) v cestnem, železniškem, pomorskem in letalskem prometu (4).

Kurir vzorce prenaša ročno, peš ali z vozilom. Poučen mora biti o pogojih in načinih transporta vzorcev za mikrobiološke preiskave, o varnem ravnanju s kužnino in o ravnanju ob nesreči pri transportu kužnine. Vzorce prenaša v transportnih torbah, ki morajo biti nepoškodovane, redno vzdrževane in čiščene (dekontaminacija notranjosti, ročajev in pokrovov, čiščenje zunanosti). V torbah je treba vzdrževati ustrezno transportno temperaturo, ki jo navajajo navodila mikrobiološkega laboratorija. Vzorce v torbi vedno prenašamo v primarni in sekundarni embalaži. Izjemoma lahko uporabimo samo primarno embalažo (na primer epruvete s krvjo, stekleničke s hemokul-

turami), vendar morajo biti v tem primeru vzorci ločeni med seboj in postavljeni pokonci v stojala ali nosilce, da preprečimo razlivanje vsebine iz primarne embalaže (4).

V zračnem cevnem transportnem sistemu (cevna pošta) vzorci potujejo po cevi tako, da jih zračna masa potiska v eno ali v drugo smer. Vzorce pošiljamo v primarni in sekundarni embalaži, ki ju vstavimo v posebno kapsulo tako, da se znotraj nje ne premikajo, za fiksiranje pa uporabimo ustrezne zaščitne obloge. Pred pošiljanjem vzorcev po zračnem cevnem transportnem sistemu se moramo dodatno prepričati, da sta primarna in sekundarna embalaža primerni za tovrsten transport (zaradi velikih pritiskov, ki so značilni za cevne transportne sisteme, se primarna ali sekundarna embalaža lahko poškoduje, zato se je treba prepričati, da je primerna za transport v zahtevnejših razmerah). Z zračnim cevnim transportnim sistemom lahko ravna le poučeno osebje. Mikrobiološki laboratorij mora v navodilih za uporabo sistema nujno določiti seznam, katerih vzorcev v sistemu ni dovoljeno prenašati, in o tem natančno poučiti osebje (4).

Pri prenašanju vzorcev v notranjem in mednarodnem prometu moramo upoštevati predpise in zakone, ki urejajo transport

kužnin na regionalni, nacionalni in mednarodni ravni v letalskem, železniškem, cestnem in pomorskem prometu. To so predpisi Mednarodne organizacije za civilno letalstvo (International Civil Aviation Organization, ICAO) in Mednarodnega združenja za zračni transport (International Air Transport Association, IATA) ter predpisi za transport po železnici (Regulation Concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Rail, RID), po cesti (European Agreement Concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road, ADR) in po morju (The International Maritime Dangerous Goods Code). V skladu s temi predpisi za pošiljanje nevarnih snovi, vključno s kužninami, zahteve določa dokument, ki ga je izdala Organizacija združenih narodov (OZN), United Nations Recommendations on the Transport of Dangerous Goods (10). Povzetek tega dokumenta, ki se primarno nanaša na prenos kužnin, je dokument, ki ga izdaja Svetovna zdravstvena organizacija (WHO), WHO Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances, in ga posodablja vsaj vsaki 2 leti (11). Pri pošiljanju vzorcev v skladu s temi dokumenti je treba upoštevati mednarodno klasifikacijo nevarnih snovi (10).

OZN v dokumentu United Nations Recommendations on the Transport of Dangerous Goods določa 9 kategorij nevarnih snovi. Kužnine so razvrščene v razred 6.2, in sicer v kategoriji A in B. V dokumentu so kužnine definirane kot snovi, za katere vemo ali domnevamo, da vsebujejo patogene mikroorganizme človeškega ali živalskega izvora in druge agense, ki lahko povzročijo bolezni pri ljudeh in živalih (10). Kužnine kategorije A so tiste snovi, ki v primeru izpostavljenosti pri sicer zdravih ljudeh ali živalih lahko povzročijo trajne zdravstvene posledice, življenje ogrožajočo ali smrtno bolezen. Večina je zajetih v seznamu Indicative list of biological agents sub-classified as Category A, UN Model Regulation (10).

Kužnine kategorije B pa so vse infektivne snovi, ki ne ustrezajo strogim kriterijem kategorije A (10). Dokument določa natančna navodila za pripravo in pošiljanje pošiljk kategorije A (Packaging Instructions P620) in kategorije B (Packaging Instructions P650). Ključna razlika pri pripravi paketov po sistemu trojnega pakiranja za kategoriji A in B je v tem, da mora biti sekundarna embalaža pri kategoriji A obvezno trdna. Druga bistvena razlika pa je označevanje zunanje embalaže z ustreznimi simboli in kodami (kategorija A: UN2814 INFECTIOUS SUBSTANCE, AFFECTING HUMANS, in UN2900 INFECTIOUS SUBSTANCE, AFFECTING ANIMALS; kategorija B: UN3373 BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY B). Transport vzorcev kategorije A lahko izvajajo le pooblaščenih prevozniki s certifikatom (10).

NAPAKE IN ODPANJA PRI TRANSPORTU VZORCEV ZA MIKROBIOLOŠKO PREISKAVO

Med najpogostejše napake in odstopanja pri transportu vzorcev za mikrobiološko preiskavo sodijo naslednje:

- vzorec je poslan v neprimernem transportnem sistemu (npr. uporabljeno je napačno transportno gojišče, ko bris za določanje respiratornih virusov ni poslan v transportnem gojišču za viruse, ampak v Stuartovem ali Amiesovem transportnem gojišču, ki sta namenjena vzorcem za kultivacijo bakterij);
- vzorec se med transportom izsuši, ker je poslan v transportnem sistemu brez transportnega gojišča ali ker je bila njegova količina ob odvzemu premajhna;
- vzorec je poslan v poškodovani embalaži (med transportom se lahko poškoduje primarna, sekundarna, zunanja embalaža, zaradi česar se vzorec razlije in je običajno izgubljen, možna pa je tudi okužba oseb in kontaminacija okolja);
- med transportom ni bila zagotovljena zahtevana transportna temperatura ali

so se pojavila temperaturna nihanja, zato je integriteta vzorca lahko ogrožena;

- med transportom je bil prekoračen maksimalni transportni čas zaradi napačne interpretacije transportnega časa, ki vključuje čas od odvzema vzorca do transporta (čakanje na transport, na primer pri vzorcih, poslanih po pošti, moramo upoštevati tudi, da ima Pošta Slovenije po sprejemu tri dni časa za dostavo pošiljke), transport in čas od sprejema vzorca do začetka mikrobiološke preiskave (čakanje na testiranje). Zato je integriteta vzorca lahko ogrožena – na primer zaradi zbiranja vzorcev v serijah na mestu odvzema z namenom zmanjšanja števila poti s točke odvzema na točko testiranja lahko prekoračimo maksimalni transportni čas, ker v skupnem transportnem času ne upoštevamo čakanja na transport.

Napake in odstopanja pri transportu vzorcev imajo nepovraten vpliv na integriteto vzorca, zato neposredno vplivajo na rezultat mikrobiološke preiskave in s tem na klinično obravnavo bolnika ali sprejem javnozdravstvenih ukrepov za obvladovanje nalezljivih bolezni (1, 2, 3). Izjemnega pomena je, da so navodila za prenos vzorcev, ki jih pripravi mikrobiološki laboratorij, natančna in nedvoumna, delavci, ki sodelujejo v procesu, pa dobro poučeni o vseh fazah postopka. Mikrobiološki laboratorij mora prav tako izdelati in objaviti kriterije za zavrnitev vzorca, na podlagi katerih je ob sprejemu mogoče ugotoviti, ali je vzorec primeren za mikrobiološko preiskavo ali pa ga laboratorij zavrne in zaprosi za morebiten ponovni vzorec (9).

ZAKLJUČEK

Prenos vzorcev je kompleksen predanalizni postopek, ki odločilno vpliva na ohranitev integritete vzorca za mikrobiološko preiskavo, s tem pa na njene rezultate in posledice. Večinoma poteka zunaj mikrobiološkega laboratorija, torej v okolju, ki ga je težko nadzorovati, v procesu pa sodelujejo različni zdravstveni in nezdravstveni delavci. Zato mora mikrobiološki laboratorij izdelati natančna in razumljiva navodila za prenos vzorcev, ki definirajo ustrezne transportne sisteme, transportne temperature, transportne čase in načine transporta za vse vrste vzorcev, ki jih preiskuje. Navodila posreduje in po potrebi pojasni naročniku preiskave.

Pri prenosu vzorcev je hkrati treba zagotoviti tudi ustrezno stopnjo varnosti oseb, ki sodelujejo v procesu, in preprečiti kontaminacijo okolja, ki bi bila lahko vir okužbe ljudi. Varnost zagotovimo z ustreznim načinom pakiranja vzorcev po sistemu trojnega pakiranja in s pravilno izvedbo transporta.

Zaradi možnega nepovratnega vpliva na kakovost vzorca je treba prenosu vzorcev posvetiti dovolj pozornosti. Nujno je kontinuirano spremljanje smernic in sprotno posodabljanje postopkov oziroma navodil. Prav tako si je treba prizadevati za čim večjo standardizacijo postopkov, kar prispeva tudi k večji primerljivosti rezultatov mikrobioloških preiskav. Za zagotavljanje pravilnega in varnega izvajanja postopkov je izjemnega pomena stalno izobraževanje vseh delavcev, ki sodelujejo v procesu.

LITERATURA

1. Grankvist K, Gomez R, Nybo M et al. Pre-analytical aspects on short- and long-term storage of serum and plasma. *Diagnosis*. 2019;6(1):51–56.
2. Engbaek K, El-Nageh M, Groen J. Specimen collection and transport for microbiological investigation. WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean Series; 8; 1995.
3. Meyer A, Cadamuro J, The preanalytical phase – a field for improvement. *Diagnosis*. 2019;6(1):1–3.
4. Nybo M, Cadamuro J, Cornes MP et al. Sample transportation – an overview. *Diagnosis*. 2019;6(1):39–43.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Quality Control of Microbiological Transport Systems; Approved Standard – 2nd Edition. CLSI document M40-A2. CLSI, Wayne, PA; 2014.
6. International Organization for Standardization (ISO). ISO/TS 20658 – Medical laboratories – Requirements for collection, transport, receipt, and handling of samples, 1st ed. Geneva, Switzerland: ISO; 2017.
7. Direktiva Sveta 93/42/EGS o medicinskih pripomočkih (EU Medical Devices Directive 93/42/EEC).
8. Direktiva Evropskega parlamenta in sveta 98/79/ES o in vitro diagnostičnih medicinskih pripomočkih (EU *In Vitro* Diagnostic Device Directive 98/79/EC).
9. Wilson ML. General Principles of Specimen Collection and Transport. *Clin Infect Dis*. 1996;22:766–77.
10. United Nations Recommendations on the Transport of Dangerous Goods. Model Regulations. Volume 1. Twenty-first revised edition. United Nations, New York and Geneva; 2019. [cited 2021 Aug 10] Available from: https://unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev21/ST-SG-AC-10-1r21e_Vol1_WEB.pdf.
11. WHO Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances 2021–2022. Geneva: World Health Organisation; 2021.

Alenka Štorman,¹ Daša Kavka,² Tina Triglav³

Elektronsko naročanje mikrobioloških preiskav

The e-ordering module for microbiological diagnostics

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: modul e-naročanje, mikrobiološke preiskave, informacijski sistem

Modul e-naročanje je spletna rešitev za elektronsko naročanje mikrobioloških preiskav, ki ponuja enoten uporabniški vmesnik vsem naročnikom, z možnostjo integracije v vsak informacijski sistem. Zasnovan je na platformi Mediskop, ki skrbi za varnostne mehanizme in komunikacijo z vsemi vpletenimi zalednimi sistemi. V času epidemije SARS-CoV-2 je modul omogočil hiter prehod na e-naročanje v številnih ustanovah. Samo v letu 2020–2021 se je na platformo Mediskop uspešno priključilo več kot 80 ustanov. Prehod na elektronsko naročanje preiskave na SARS-CoV-2 je omogočil vzdržnost diagnostičnega procesa in je eden izmed najpomembnejših dosežkov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani ter Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano v času epidemije. E-naročanje omogoča preprosto opredelitev vzorca in lažjo izbiro ustrezne mikrobiološke preiskave, uporabniku pa nudi tudi pregled naročil. V laboratoriju se zaradi avtomatskega prenosa podatkov, ustvarjanja protokolov in delovnih listov zmanjša možnost napak. Vpeljava e-naročanja v vsakodnevno rutinsko delo korenito spreminja obstoječe delovne procese, vendar bo dolgoročno omogočila učinkovitejše digitalno poslovanje in razbremenitev.

ABSTRACT

KEY WORDS: e-ordering module, microbiological diagnostics, information system

The e-ordering module is an online solution for electronic ordering of microbiological tests that provides the same interface to all customers and can be integrated into any information system. It is based on the Mediskop platform, which provides security mechanisms and communication with all back-end systems involved. During the SARS-CoV-2 epidemic, the module enabled a rapid transition to e-ordering at many facilities. In 2020–2021 alone, over 80 facilities successfully joined the Mediskop platform. The transition to electronic ordering of SARS-CoV-2 tests has made the diagnostic process manageable and represents one of the most important achievements for the Institute of Microbiology and Immunology Faculty of Medicine, University of Ljubljana, and the

¹ Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo, Gregorčičeva 5, 3000 Celje. Korespondenca/correspondence: alenka.storman@nlzoh.si

² Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo, Gregorčičeva 5, 3000 Celje. Korespondenca/correspondence: dasa.kavka@nlzoh.si

³ Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška cesta 4, 1104 Ljubljana, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani. Korespondenca/correspondence: tina.triglav@mf.uni-lj.si

National Laboratory for Health, Environment and Food during the epidemic. Electronic ordering allows for the correct identification of the sample and helps the user select the appropriate microbiological test. It also provides the user with an overview of orders. In the laboratory, the possibility of errors is reduced through automatic data transfer, protocol generation and worksheets. Introducing e-ordering into daily routine work radically changes existing workflows, but in the long run enables more efficient digital business and reduces the burden on existing processes.

UVOD

Zaradi trendov, ki jih z razvojem novih informacijskih tehnologij prinaša digitalizacija, so v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) skupaj s podjetjem SRC Infonet, d. o. o., razvili modul e-naročanje (EMBL), ki omogoča elektronsko izmenjavo mikrobioloških naročil in izvidov. Gre za enega večjih dosežkov v javnem zdravstvu v Sloveniji v zadnjih desetih letih (1). Modul so prevzeli tudi na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (IMI), kjer je bilo e-naročanje najprej omogočeno na Univerzitetni psihiatrični kliniki Ljubljana in na Kliničnem oddelku za urologijo Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Ljubljana.

Naročanje mikrobioloških preiskav zaradi velike pestrosti in nabora vzorcev, ki morajo biti za kakovostno izvedbo preiskav natančno opredeljeni, zahteva določeno mero usposobljenosti. Upoštevati je treba dejavnost, ki jo opravlja posamezen naročnik, in zagotoviti vse dodatne podatke za pravilno interpretacijo rezultatov. Na strani naročnikov se povečuje potreba po prejemanju izvidov v elektronski obliki zaradi vodenja, analiziranja ter hranjenja poslovnih in strokovnih podatkov, ki jih z izvidom posreduje mikrobiološki laboratorij.

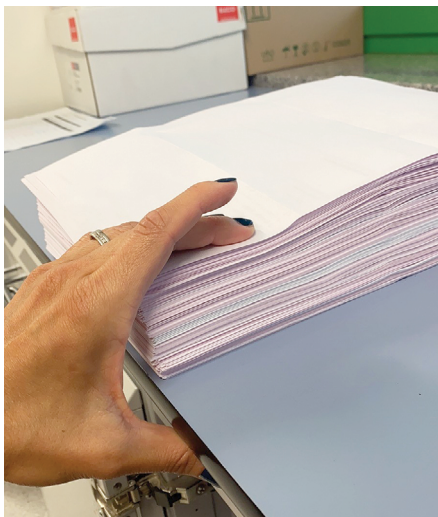
EPIDEMIJA SARS-COV-2 IN E-NAROČANJE

V času epidemije SARS-CoV-2 je modul omogočil hiter prehod na e-naročanje na večini vstopnih točk za testiranje

na SARS-CoV-2 v Sloveniji. Samo v letu 2020–2021 se je na platformo Mediskop, ki vsebuje modul EMBL, uspešno priključilo že več kot 80 ustanov. Trenutno je na EMBL priključenih več kot 20 bolnišnic, 47 zdravstvenih domov, več kot 30 zasebnih ustanov in 13 laboratorijev. Vzpostavljene povezave bodo omogočile nadaljevanje projekta s prehajanjem na e-naročanje tudi na primarni ravni.

V letu 2021 se je na željo UKC Ljubljana poleg e-naročanja preiskave na SARS-CoV-2 v relativno kratkem času prešlo na elektronsko naročanje vseh mikrobioloških preiskav na številnih klinikah. E-naročanje je bilo v času nastanka članka vzpostavljeno na desetih klinikah znotraj UKC, predvideno je dodatno vzpostavljano.

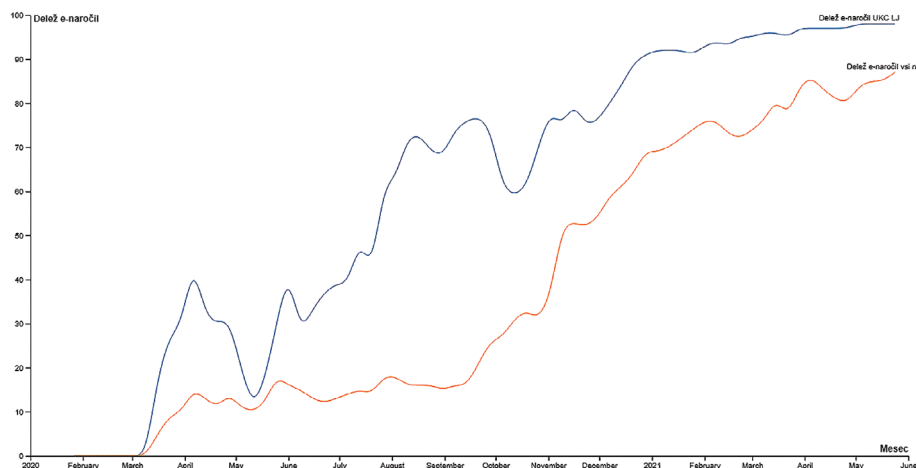
Ob epidemiji je tako za NLZOH kot tudi za IMI največji izziv pomenilo izredno veliko število bolnišnic, klinik in zdravstvenih domov, ki jih je bilo treba prevesti na e-naročanje. Hkrati se je zelo hitro izjemno povečalo število vzorcev, ki so bili poslani na preiskavo na SARS-CoV-2. Ročno vnašanje podatkov iz spremnih listov v laboratorijski informacijski sistem (LIS) je ob stotinah in nato tisočih vzorcev dnevno pomenilo nesprejemljive obremenitve v sprejemnih pisarnah mikrobioloških laboratorijev (Slika 1a, Slika 1b). Ob preseženih diagnostičnih zmogljivostih mikrobioloških laboratorijev je bilo nujno zagotoviti zanesljivo izdajanje rezultatov preiskav in avtomatski prenos podatkov, da se je zmanjšalo število morebitnih napak, ki bi lahko neposredno vplivale na obravnavo bolnikov (hospitali-



Slika 1a. Slika 1b. Izredno veliko število spremnih listov za preiskavo na SARS-CoV-2 na IMI (1a) in NLZOH (1b) na začetku epidemije, ki jih je bilo treba ročno vnašati v laboratorijski informacijski sistem

zacija, izolacija, podaljšanje časa do operativnih posegov ipd.) (2). Prehod na e-naročanje preiskave na SARS-CoV-2 (Slika 2) je omogočil vzdržnost diagnostičnega procesa in je eden izmed najpomembnejših dosežkov za IMI in NLZOH. Ob prehodu je bilo nujno povezovanje in usklajevanje med zaposlenimi v mikrobioloških laboratorijih,

podjetja SRC Infonet, naročniki in vsemi obstoječimi informacijskimi sistemi (IS) posameznih ustanov. Za ustanove in oddelke, pri katerih se je prehajalo na e-naročanje vseh mikrobioloških preiskav, so bile potrebne tudi dodelave obstoječega kataloga preiskav in naročilnic, prilagojenih potrebam posameznega oddelka.



Slika 2. Delež e-naročil, sprejetih na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo za preiskavo na SARS-CoV-2.

MODUL E-NAROČANJE

Modul e-naročanje je spletna rešitev za elektronsko naročanje preiskav v LIS in ponuja enoten spletni grafični uporabniški vmesnik vsem naročnikom preiskav, ki ga je mogoče integrirati v vsak IS naročnika. Poleg tega modul naročnikom ponuja tudi naročanje preiskav z uporabo mobilne aplikacije, ki na specifičnih odzvemih mestih lahko še dodatno pospeši postopek naročanja. Modul je zasnovan na platformi Mediskop, ki skrbi za varnostne mehanizme in komunikacijo z vsemi vpletenimi zalednimi sistemi.

E-naročanje prinaša veliko prednosti za naročnika, med drugim preprosto opredelitev vzorca in lažjo izbiro ustrezne mikrobiološke preiskave. Nove preiskave so dodane takoj, ko so uvedene. Naročnik ima pregled nad naročili in vedno ve, v kateri fazi izvajanja je naročilo (Slika 3). Takoj ko je v okviru preiskave znan kakšen dodaten podatek, je v obliki delnega izvida že v naročnikovem IS. Dodatno je omogočen prenos kritičnih značilnosti v naročnikov IS.

E-naročanje prinaša prednosti tudi za mikrobiološki laboratorij. Prevzem vzorcev je hitrejši, saj so vzorci in preiskave jasno opredeljeni. Vsi podatki se avtomatsko prenesejo iz naročnikovega IS v LIS, kar omeji število napak, saj ni ročnega vnosa v LIS. Avtomatsko se ustvarjajo protokoli in delovni listi. Naročilo se lahko preprosto preusmeri v drug laboratorij.

Delovanje e-naročanja je treba nenehno spremljati, ker se lahko pojavljajo težave tako na strani naročnika ali mikrobiološkega laboratorija kot tudi na medmrežju (3). Takojšnja odprava napak je ključna. Z analizo napak in na podlagi predlogov iz prakse se modul nenehno nadgrajuje in tako izboljšuje.

ELEKTRONSKE NAROČILNICE

Naročilnice, ki so v modulu vidne uporabnikom, so razdeljene v različne sklope glede na anatomsko lokacijo (npr. okužbe dihal, sečil), glede na proces laboratorijske diagnostike (npr. molekularne, serološke, bakteriološke preiskave) ali kot definirana posebna skupina obravnavanih bolnikov (npr. nosečnice, novorojenčki). Posamezna preiskava se lahko smiselno uvrsti v več naročilnic. Nabor preiskav v posamezni naročilnici z istim imenom se lahko razlikuje po naročnikih. Naročniki imajo možnost sooblikovanja posebnih naročilnic s poljubnim naborom preiskav.

V zgornjem delu naročilnice so podatki o bolniku. Poleg avtomatsko vnesenih identifikacijskih podatkov bolnika se lahko dodajo tudi določena opsijska ali obvezna polja. Pri vnosu diagnoz je zelo zaželen vpis tistih diagnoz, ki lahko vplivajo na mikrobiološko diagnostiko. Nekatere preiskave imajo nase vezane nujne podatke, kot so npr. podatek o nosečnosti in predviden datum poroda ob naročanju serologije na to-

646168, A32100003, TEST EMBLV3 ŽENSKA (SMPL), 62 let (14.01.1959), Funkc., 26.08.2021 (10994260), Kreirana			
Ime	Datum	Status	Planirani datum
NADZORNI VZORCI, , Planirana	26.08.2021 10:13	Planirana	26.08.2021 10:13
EPIDEMIJA (SARS-CoV-2) - SAMOPLAČNIK + INDIKACIJA, , Planirana	26.08.2021 10:07	Planirana	26.08.2021 10:07
NADZORNI VZORCI, 2021/15/23, Avtorizirana	26.08.2021 09:55	Planirana	26.08.2021 09:55
Črevesne okužbe - INFONET PUSTI, , Planirana	26.08.2021 09:16	Planirana	26.08.2021 09:16
Okužbe sečil - INFONET PUSTI, 2021/05/150142,2021/35/470,2021/65/5, Avtorizirana	26.08.2021 09:16	Planirana	26.08.2021 09:16
NOSEČNICE, , Prekinjena	26.08.2021 09:15	Prekinjena	26.08.2021 09:26
Hemokulture, likvor - INFONET PUSTI, , Planirana	26.08.2021 09:14	Planirana	26.08.2021 09:14
EPIDEMIJA (COVID19), , Zavrnjena. Nepravilnosti pri odvzemu - ne...	26.08.2021 09:14	Zavrnjena	26.08.2021 09:14

Slika 3. Prikaz seznama naročil z različnimi statusi v informacijskem sistemu naročnika.

ksoplazmozo, podatek o protimikrobnem zdravljenju pri nekaterih bakterioloških preiskavah, indikacija za testiranje pri molekularni preiskavi na SARS-CoV-2.

Po izbiri ustreznega vzorca in preiskave oboje dodamo na naročilo. Avtomatsko se vnese trenutni datum in čas odvzema, ki ga uporabnik lahko spremeni na dejanski čas odvzema. Naročilnico lahko pošljemo ali pa jo shranimo, če je predviden kasnejši odvzem vzorca.

Omogočeno je tudi ustvarjanje t. i. paketov preiskav. Paket zajema nabor preiskav, ki jih je naročnik opredelil vnaprej in jih je ob obravnavi bolnika smiselno naročati hkrati. Paket omogoča prenos vseh izbranih preiskav z enim klikom, naknadno pa je še vedno mogoče odstraniti posamezno preiskavo, če se izkaže, da ni potrebna. Trenutno je največ paketov pripravljenih za različne odvzeme nadzornih kužnin.

OPTIMIZACIJA IN PRILOŽNOSTI ZA IZBOLJŠAVE

Po hitrem prehodu na e-naročanje v številnih ustanovah se je izkazalo, da obstaja še precej možnosti za izboljšave, tako pri prilagajanju uporabniške izkušnje in poenostavitvi naročanja kot tudi pri procesih v mikrobioloških laboratorijih, kot je vzpostavitev e-triaže, sprejem vzorcev prek črtnih kod, vzpostavitev odločitvenih tabel ipd. Nujen korak pred vzpostavitvijo e-naročanja je praktično izobraževanje naročnikov in nato možnost stalne komunikacije ter podpore naročnikom.

V letu 2021 je v načrtu nov modul e-naročanja, ki bo omogočal preklap z vzorca/kužnine na preiskavo, posodobljen pa bo tudi iskalnik, ki bo zmožen iskanja po celotnem katalogu preiskav, ne le znotraj posamezne naročilnice. V največji možni meri bodo upoštewane pobude naročnikov, zato bo v poletnih mesecih pripravljena anketa za uporabnike, katere rezultati bodo pomagali k izboljšanju uporabniške izkušnje.

Dolgoročni načrti so usmerjeni v oblikovanje uporabniku prilagojenega in v čim večji meri poenostavljenega procesa e-naročanja (3), ki bo omogočal tudi vodenje evidenc najpogosteje naročenih preiskav, ustvarjanje lastnih paketov preiskav in dodaten prikaz zahtev glede odvzema, potrebnih količin in prenosa kužnin v mikrobiološki laboratorij.

ZAKLJUČEK

Vpeljava e-naročanja v vsakodnevno rutinsko delo na kliničnih oddelkih, ambulantah in v mikrobioloških laboratorijih korenito spreminja delovne procese, vendar bo digitalizacija dolgoročno omogočila učinkovitejše digitalno poslovanje in razbremenitev, hkrati pa bo zagotovila učinkovit in zanesljiv prenos rezultatov mikrobioloških preiskav, kar neposredno vpliva na obravnavo bolnika (3, 4). Zato se zahvaljujemo uporabnikom za sodelovanje in veliko mero potrpežljivosti, predvsem pa se zahvaljujemo sodelavcem NLZOH in IMI, ki se trudijo vpeljati in optimizirati proces e-naročanja v tesnem sodelovanju z naročniki in SRC Infonet.

LITERATURA

1. Kavka D. E-izmenjava mikrobioloških naročil in izvidov. Dosežki v javnem zdravju v Sloveniji. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2021. p. 119.
2. Weemaes M, Martens S, Cuypers L, et al. Laboratory information system requirements to manage the COVID-19 pandemic: A report from the Belgian national reference testing center. *J Am Med Inform Assoc.* 2020;27(8):1293–9.
3. Rhoads DD, Sintchenko V, Rauch CA, et al. Clinical Microbiology Informatics. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):1025–47.
4. Egl A. Digitalization, clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(10):1289–90.

Kristina Nadrah,^{1,2} Jolanda Munih¹

Odvzem hemokultur

Blood culture sample collection

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: hemokultura, kontaminacija, aseptična tehnika

Hemokultura je pomembna mikrobiološka preiskava, ki je pri mnogih okužbah ključna za identifikacijo povzročitelja in ustrezno zdravljenje. Pravilen odvzem lahko pomembno zmanjša možnost kontaminacije in vodi k boljšim kliničnim izidom.

ABSTRACT

KEY WORDS: Blood culture, contamination, aseptic technique

Blood culture is an important microbiological diagnostic test which is a basis for pathogen identification and appropriate treatment in many infections. Appropriate collection of blood cultures can reduce contamination risk and lead to better patient outcomes.

UVOD

Hemokultura je mikrobiološka preiskava, s katero v bolnikovi krvi dokazujemo prisotnost mikroorganizmov. Pri odvzemu sta pomembna čas in način, količina krvi, število odvzetih hemokulturnih stekleničk, predhodna antibiotična terapija in prenos v laboratorij. Vsi naštetih dejavniki lahko vplivajo na uspešnost preiskave in na pogostost lažno pozitivnega rezultata, tj. kontaminacije z bakterijami kožne flore, zato ima vsaka zdravstvena ustanova navodila za odvzem hemokultur.

KAKO JEMLJEMO HEMOKULTURE?

Prostor, kjer jemljemo hemokulture, mora biti čist in miren. Odvzem opravimo asep-

tično z uporabo pripomočkov za enkratno uporabo ter ob upoštevanju standardnih ukrepov za preprečevanje prenosa okužb. Upošteevamo tudi navodila proizvajalca stekleničk za odvzem krvi (1).

Hemokulture jemljemo, kadar ima bolnik zvišano ali znižano telesno temperaturo, mrzlico, pred uvedbo antibiotika, kadar sumimo na bakterijsko okužbo ali pred menjavo antibiotika, če predhodno zdravljenje bakterijske okužbe ni bilo uspešno. Pri sumu na infekcijski endokarditis vzamemo običajno najmanj tri pare hemokultur v večurnem razmiku, saj s tem povečamo verjetnost izolacije povzročitelja.

Kri za hemokulture običajno jemljemo iz periferne vene, kadar sumimo na okužbo žilnih pristopov, pa tudi iz centralnega ven-

¹ Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva 2, 1000 Ljubljana

² Medicinska fakulteta UL, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana. Korespondenca: kristina.nadrah@mf.uni-lj.si

Tabela 1. Količina odvzete krvi in tip hemokulturne stekleničke sta odvisna od starosti (1).

Starost	Količina krvi	Število stekleničk	Hemokulturna steklenička
do 1 leta	1–3 ml	1	BD Bactec Peds
1–6 let	1 × 5 ml ali 2 × 3 ml	1 ali 2	BD Bactec Peds
6–12 let	5 ml	2	BD Bactec Peds
nad 12 let	8–10 ml	2	BD Bactec

skega kanala, dializnega katetra, arterijske linije ali porta. Prvi vzorec iz katetra vedno zavržemo. Krvi ne jemljemo iz krakov centralnega venskega kanala, po katerih tečejo življenjsko pomembna zdravila, kri ali parenteralna prehrana (1).

Vedno vzamemo dva para (aerobno in anaerobno stekleničko) v razmiku od 10 do 60 minut (optimalno 30 minut) z različnih mest in vsakič iz druge roke. Pri odraslih odvajamo 8–10 ml krvi v vsako stekleničko, pri otrocih pa je količina odvisna od starosti (Tabela 1). Vedno najprej odvajamo kri v aerobno stekleničko, saj s tem povečamo verjetnost izolacije morebitnih anaerobnih mikroorganizmov (1).

Odvzete hemokulture opremimo s spremnim listom, kjer so navedeni podatki, in jih prenesemo v laboratorij v največ dveh urah. Če to ni mogoče, jih lahko shranjujemo pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo, največ 12 ur.

KONTAMINACIJA HEMOKULTUR

Ker hemokulture običajno jemljemo iz periferne vene, se pri določenem odstotku odvzemov krvi kontaminira. To lahko vodi v čezmerno predpisovanje antibiotikov, kadar pravzaprav niso potrebni, prav tako pa lahko zavede zdravnika in poveča število nepotrebnih preiskav, s čimer se povečajo obremenitev za bolnika in možnosti resnih zapletov.

Na možnost kontaminacije vplivajo številni dejavniki, npr. odvzem hemokultur brez jasne indikacije, jemanje iz žilnih katetrov, odkloni od protokola za jemanje hemokultur, kontaminacija kože po razkuževanju, hitenje, premalo osebja, osebje, ki je sočasno zaposleno tudi z drugimi bolniki, pomanjkanje izkušenj, menjavanje osebja, pomanjkanje izobraževanja osebja, neustrezen transport, pomanjkljiva priprava pripomočkov pred odvzemom, neuporaba osebne varovalne opreme itn. (2–6). Kontaminacij je več tudi pri starejših bolnikih, bolnikih s kronično ledvično boleznijo ali odpovedjo ledvic na hemodializi, kritično bolnih, podhranjenih ipd. (5).

Delež kontaminacij lahko pomembno zmanjšamo, če hemokulture jemlje specializirano osebje z uporabo sterilnih setov in če ima ustanova pripravljena navodila za standardni postopek odvzema. Prav tako je pomembno, da ima osebje dovolj časa in ni preutrujeno (2, 4, 6, 7).

ZAKLJUČEK

Pravilen odvzem hemokultur pomembno vpliva na pravilnost rezultata preiskave. Posledica nepravilnega odvzema je lahko kontaminacija pa tudi lažno negativen rezultat, ki lahko vodi v slabši klinični izid. Poleg standardnega postopka odvzema sta pomembna tudi izobraževanje osebja ter skrb za ustrezne kadrovske normative.

LITERATURA

1. Univerzitetni klinični center Ljubljana. Odvzem krvi Interni standard Available from: <https://edge.kclj.si/#documents/046cab3f1d984256a8a09dab5e32b8d6/?-searchText=odvzem%20krvi&pageSi-ze=50&page=1>.
2. Gander RM, Byrd L, DeCrescenzo M, Hirany S, Bowen M, Baughman J. Impact of Blood Cultures Drawn by Phlebotomy on Contamination Rates and Health Care Costs in a Hospital Emergency Department. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(4): 1021–4.
3. McBryde ES, Tilse M, McCormack J. Comparison of contamination rates of catheter-drawn and peripheral blood cultures. *J Hosp Infect.* 2005; 60(2): 118–21.
4. Bekeris LG, Tworek JA, Walsh MK, Valenstein PN. Trends in blood culture contamination: a College of American Pathologists Q-Tracs study of 356 institutions. *Arch Pathol Lab Med.* 2005; 129(10): 1222–5.
5. Chang CJ, Wu CJ, Hsu HC, Wu CH, Shih FY, Wang SW, et al. Factors Associated with Blood Culture Contamination in the Emergency Department: Critical Illness, End-Stage Renal Disease, and Old Age. Lazzeri C, editor. *PLOS ONE.* 2015; 10(10): e0137653.
6. El Feghaly RE, Chatterjee J, Dowdy K, Stempak LM, Morgan S, Needham W, et al. A Quality Improvement Initiative: Reducing Blood Culture Contamination in a Children's Hospital. *Pediatrics.* 2018;142(4):e20180244.
7. Self WH, Speroff T, Grijalva CG, McNaughton CD, Ashburn J, Liu D, et al. Reducing Blood Culture Contamination in the Emergency Department: An Interrupted Time Series Quality Improvement Study. Lewis LM, editor. *Acad Emerg Med.* 2013 Jan; 20(1): 89–97.

Kristina Fujs Komloš,¹ Natalija Planinc Strunjaš,² Ivana Velimirović¹

Likvor za mikrobiološke preiskave

Microbiological examination of cerebrospinal fluid

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: likvor, mikrobiološka diagnostika, transport

Cerebrospinalna tekočina ali likvor je telesna tekočina, ki nastaja v horoidnem pletežu možganskih ventriklov. Njeni poglavitni funkciji sta mehanska zaščita možganov pred poškodbami ter transport hranil in odpadnih snovi v osrednjem živčevju. V normalnih razmerah ostaja sestava cerebrospinalne tekočine nespremenjena, vse spremembe sestave pa odražajo dogajanje v osrednjem živčevju, zato je analiza cerebrospinalne tekočine pomemben dejavnik pri opredelitvi vzrokov za različna bolezenska stanja, ki zajemajo osrednje živčevje. Vzorčenje in analiza cerebrospinalne tekočine je diagnostični postopek, ki vključuje odvzem vzorca za laboratorijsko, mikrobiološko in citološko testiranje. Postopek je invaziven in je v domeni zdravnika. Neustrezen odvzem, količina in način shranjevanja zmanjšujejo količino informacij, ki jih pridobimo s postopkom, in onemogočajo hitro postavitve diagnoze. V prispevku se bomo poleg postopka vzorčenja cerebrospinalne tekočine osredotočili predvsem na količine, potrebne za mikrobiološke preiskave, na to, kakšen vpliv na preživetje in ohranitev strukture mikroorganizmov imajo pogoji transporta in shranjevanja, ter na izvor najpogostejših napak in njihov vpliv na rezultate obdelave kužnin.

ABSTRACT

KEY WORDS: cerebrospinal fluid, microbiological diagnostics, transport

Cerebrospinal fluid is a bodily fluid produced in the choroid plexus of the cerebral ventricles. Its main functions are the mechanical protection of the brain against damage and the transport of nutrients and waste materials in the central nervous system. Under normal conditions, the composition of the cerebrospinal fluid remains unchanged and all changes in its composition reflect the activities in the central nervous system. Therefore, its analysis is an important factor in defining the causes of various diseases involving the central nervous system. Cerebrospinal fluid sampling and analysis is a diagnostic procedure that involves taking a sample for laboratory, microbiological and cytological testing. The process of collecting the sample is invasive and is in the domain

¹ Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

² Klinika za infektivne bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana

of the physician. Inadequate collection, quantity and method of storage reduce the amount of information obtained from the procedure and make it impossible to make a quick diagnosis. In addition to the cerebrospinal fluid sampling procedure, in this paper we will focus mainly on the quantities required for microbiological examinations, what effect transport and storage conditions have on the survival and preservation of the structure of microorganisms, as well as the origin of the most common errors and their impact on the results of the processing of infectious materials.

UVOD

Za okužbe osrednjega živčevja (OŽ) so odgovorni številni povzročitelji, vključno z bakterijami, virusi, glivami in paraziti. Likvor je dragocen klinični vzorec, katerega testiranje nam zagotavlja najpomembnejšo informacijo za postavitve diagnoze najrazličnejših okužb, bolezni in hudih stanj, ki prizadenejo možgane in hrbtenjačo. Hitra določitev povzročitelja okužbe OŽ je ključnega pomena za pravočasno in ustrezno obravnavo bolnika.

Likvor ima pomembno vlogo pri normalnem delovanju možganov. Njegova sestava se odraža v delovanju možganov in se spremeni pri nekaterih nevroloških boleznih, predvsem vnetjih in okužbah. Prav tako se nepravilnosti v delovanju možganov lahko odrazijo na sestavi likvorja, zato nam njegova analiza lahko ponudi pomembne informacije za postavitve diagnoze. Pri odraslih prostornina likvorja znaša med 125 in 150 ml. Osemdeset odstotkov likvorja proizvede horoidni plexus, preostali del pa nastaja v ventrikularnem endhimu, arahnoidni membrani in možganskem tkivu (1). Dinamika likvorja je odvisna od ravnovesja med proizvodnjo in absorpcijo. Likvor, ki nastaja v stranskih ventriklih, teče skozi intraventrikularne odprtine v tretji in nato v četrti ventrikel preko možganske akvadukta. Skozi odprtine (tako imenovane foramne Luschka in Magendie) prehaja v subarahnoidni prostor med notranjo in srednjo možgansko ovojnico (arachnoidea in pia mater). Dinamično kroženje likvorja poganja njegovo izločanje v horoidnem

pletežu s hitrostjo približno 25 ml/h, kar izpodrine staro tekočino, ki se nato absorbira preko arahnoidnega granulacijskega tkiva v sistemsko kri. S tem se zagotovi stabilno okolje v možganih in omogoči odstranjevanje odpadnih produktov (2). Likvor ima dve poglavitni funkciji. Z oblitvanjem možganov zmanjšuje njihovo težo in preprečuje mehanske poškodbe, obenem pa zagotavlja prenos hranil in odpadnih produktov v OŽ in iz njega. Kot smo omenili, po izhodu iz ventrikularnega sistema likvor steče v subarahnoidne cisterne na dnu možganov, en del pa se steka v subarahnoidni prostor hrbtenjače. Slednja se konča v višini prvega oziroma drugega ledvenega vretenca, subarahnoidni prostor pa se razteza do drugega sakralnega vretenca. Ta vmesni prostor imenujemo ledvena cisterna in ravno to mesto je dostopno za varno vzorčenje likvorja. Likvor odvajamo z lumbalno punkcijo (LP), ki je invaziven diagnostični postopek in jo vedno opravi zdravnik (1).

ODVZEM LIKVORJA Z LUMBALNO PUNKCIJO

Že leta 1891 je Quincke opisal postopek LP, ki se je takrat uporabljala z namenom zmanjševanja intrakranialnega tlaka pri otrocih z meningitisom. Danes jo najpogosteje izvajamo v diagnostične, redkeje pa v terapevtske namene, kot je odstranitev delne količine likvorja za zmanjševanje intrakranialnega pritiska ali za tako imenovano intratekalno aplikacijo zdravil.

Pred posegom je potrebno pisno soglasje bolnika. Treba mu je razložiti po-

stopek in zaplete, ki se lahko pojavijo. Ti vključujejo lokalno nelagodje, radikularno bolečino, krvavitev, likvor fistulo, okužbo in postpunkcijski glavobol. Najpogostejši zaplet je postpunkcijski glavobol, ki ga opazimo pri 0,5–35 % preiskovancev (3).

LP je kontraindicirana, če tveganje posega odtehta morebitno korist. Kontraindikacije za lumbalno punkcijo so povzete v Tabeli 1 (4). Slikovna diagnostika za oceno varnosti LP je potrebna pred LP pri sumu na povišan intrakranialni tlak, pri motnji zavesti z žariščnimi izpadi, ob edemu papile vidnega živca ter lateralizaciji in je ne izvajamo rutinsko.

Tabela 1. Kontraindikacije za lumbalno punkcijo.

Število trombocitov $< 50 \times 10^9/l$ INR $> 1,3$
Lokalna okužba na mestu punkcije Zvišan intrakranialni tlak z nevarnostjo herniacije
Zdravljenje z antitrombotiki (relativna KI)

Legenda: INR – Mednarodno normalizirano razmerje, KI – kontraindikacija

LP je aseptični poseg, katerega postopek je natančno opredeljen v t. i. standardnih operativnih postopkih. Za izvedbo potrebujemo voziček, ki ga pred posegom očistimo in nanj položimo potrebne materiale. Ves čas, med pripravo na poseg in med samim posegom, upoštevamo načela asepse.

V praksi obstajata dva položaja, ki ju lahko zavzame pacient med LP. V bočnem (praviloma levem) položaju pacient leži na strani z maksimalno upognjenim vratom, kolki in koleni. Bolnik je v t. i. fetalnem položaju. V sedečem položaju pacient sedi na robu postelje in usloči hrbet. Ko je pacient v pravilnem položaju, s tipanjem določimo primerno mesto za LP – med tretjim in četrtem oziroma četrtem in petim lumbalnim prostorom. Pri določitvi primerne mesta si pomagamo tako, da otipamo iliakalni gre-

ben. Navidezna črta, ki spaja oba grebena, se nahaja v višini spinoznega odrastka četrtega ledvenega vretenca. Nato otipamo tudi zgoraj omenjene, za LP primerne, medvretenčne prostore. Ko določimo mesto, s sterilnimi rokavicami razkužimo kožo in sterilno polje zaščitimo. Včasih se zdravnik odloči za lokalno anestezijo. Za LP se uporablja atravmatska igla ali Quinckejeva igla z majhnim premerom. Z iglo na slepo prodiramo skozi kožo, podkožno tkivo in ligamente ter vstopimo skozi epiduralni prostor, duro in arahnoidno ovojnico v subarahnoidni prostor. Ker gre za »slepi« poseg, ob vstopu v subarahnoidni prostor preverimo, ali likvor priteka. Če ga ni, moramo iglo nekoliko izvleči in spremeniti smer. Ta proces je precej nelagodan, zato moramo ves čas vzdrževati pomirjujoč odnos z bolnikom. Ko je igla v subarahnoidnem prostoru, likvor praviloma priteče takoj. Zbiramo ga s prostim iztekanjem. Zaradi nevarnosti herniacije možganov aspiracija likvorja ni dovoljena. Po posegu bolnika postavimo v ležeči položaj, kjer počiva (3). Standardne količine likvorja, ki bi jo morali odvzeti med LP, ni, velja pa pravilo, da odvmemo najmanjšo možno količino, ki jo za predvidene preiskave potrebujemo, zato je treba preiskave vedno skrbno načrtovati. Pri vsaki diagnostični punkciji del odvzetega likvorja pošljemo v laboratorij na pregled biokemične sestave in prisotnih celic. Če sumimo na morebitno maligno obolenje v OŽ, je treba likvor poslati v citološki laboratorij. Za citološki pregled je potrebnih 1,5 do 5 ml likvorja (5). Ob sumu na okužbo pa je količina likvorja odvisna od predvidenih preiskav, kar je opisano v nadaljevanju prispevka.

KOLIČINA LIKVORJA, POGOJI ZA TRANSPORT IN SHRANJEVANJE ZA MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE

Količina likvorja, potrebna za mikrobiološke preiskave, je odvisna od nabora patogenov, ki jih bomo določali v likvorju,

in zelene preiskave. V likvorju je bakterij običajno zelo malo, zato je za bakteriološko analizo treba odvzeti vsaj 1 ml likvorja v sterilno stekleničko z navojem (brez dodatkov). Če želimo mikrobiološko diagnostiko razširiti še na virusne, glivne in parazitske povzročitelje okužb OŽ, potrebujemo vsaj še 1 ml likvorja za dokaz virusov, vsaj 3 ml za dokaz gliv v kulturi in 2 ml za ugotavljanje prisotnosti parazitov v likvorju. V vseh primerih likvor odvzamemo v sterilno stekleničko z navojem brez dodatkov. Odvzem likvorja v epruvete za odvzem krvi ni primeren, saj epruvete vsebujejo dodatke, ki motijo mikrobiološko analizo likvorja (6).

Če je likvorja malo, naročenih mikrobioloških preiskav pa veliko, je treba na spremnem listu za mikrobiološke preiskave navesti, katere preiskave so glede na klinično sliko najnujnejše in v korelaciji z rezultati drugih laboratorijskih preiskav. Pomembno je, da bolniku likvor odvzamemo pred uvedbo zdravljenja (antibiotičnega, protivirusnega), saj zdravljenje zmanjša že tako majhno število patogenov v likvorju (7, 8). Če je bolnik že na zdravljenju, je pomembno na spremnem listu označiti vrsto in trajanje terapije.

Pogoji transporta in shranjevanja odvzete likvorja pomembno vplivajo na preživetje in ohranitev strukture mikroorganizmov. Ohranjanje viabilnosti mikroorganizmov je ključnega pomena, ko jih želimo gojiti v kulturi. Za molekularno analizo mikroorganizmov viabilnost ni ključnega pomena, je pa pomembno preprečiti njihovo razgradnjo, zlasti genoma, katerega prisotnost dokazujemo z molekularnim testiranjem (9, 10).

Optimalni čas za prenos kužnine v mikrobiološki laboratorij je 15 minut za kultivacijo bakterij in gliv, za ostale preiskave pa do 2 uri. Če transport kužnine v tem času ni mogoč, je treba zagotoviti prenos likvorja v laboratorij najkasneje v 24 urah. Likvor se lahko v laboratorij prenese po cev-

ni pošti bolnišnice ali po kurirju. Nikakor ga ne pošiljamo po navadni pošti, kjer so pogoji transporta nenadzorovani in neustrezni: laboratorij ne more zagotoviti veljavnosti rezultatov mikrobioloških analiz, zato tako poslan likvor običajno zavrne (6).

Temperatura je pomemben okoljski dejavnik, ki kritično vpliva na rezultat mikrobiološke preiskave. Pogoji shranjevanja po odvzemu likvorja in med transportom so odvisni od vrste patogena, zelene preiskave in mikrobiološke metode (Tabela 2). Za kultivacijo bakterij in gliv je treba likvor čim prej transportirati na sobni temperaturi (15 minut ali najkasneje v 24 urah) v mikrobiološki laboratorij. Shranjevanje likvorja v hladilniku ali zamrzovanje uniči viabilnost bakterij in gliv, kar kritično zmanjša diagnostično občutljivost gojenja v kulturi. Za določitev kriptokoknega antigena je primeren likvor, ki je v laboratorij dostavljen v 2 urah na sobni temperaturi ali v 24 urah pri 4 °C (6).

Nasprotno je likvor za molekularno diagnostiko (brez kultivacije ali celične kulture) treba shraniti in transportirati pri 4 °C do 24 ur ali na -20 °C, če pričakujemo, da bo transport trajal več kot 24 ur, saj so virusi, zlasti tisti z RNK-genomom, podvrženi degradaciji genoma pri višjih temperaturah (6).

V posebnih kliničnih primerih, ko so potrebne nadaljnje ali dodatne preiskave, je smiselnost dodatno naročenih preiskav treba uskladiti s primernostjo likvorja za zelene analize zaradi različnih pogojev shranjevanja. Likvor, ki je bil shranjen na temperaturah od -20 do -80 °C, za kultivacijo ni primeren, lahko pa ga uporabimo za ugotavljanje prisotnosti patogenov z bolj občutljivimi in hitrimi molekularnimi metodami. Ravno nasprotno pa likvorji, poslani na bakterijsko ali glivno kultivacijo, zaradi pogojev shranjevanja (sobna temperatura) niso primerni za dodatne virološke ali molekularne preiskave.

Takoj po odvzemu likvorja je treba kužnino označiti s podatki o bolniku,

Tabela 2. Količina ter pogoji shranjevanja in transporta likvorja za mikrobiološke preiskave.

Preiskava	Količina likvorja	Čas in temperatura transporta	Opombe
Bakterije – kultivacija	Sterilna epruveta z navojem ≥ 1 ml. Izjemoma pri dolgem transportu ≥ 24 ur odvzem v aerobno stekleničko za hemokulturo, transport enako kot hemokultura pri 35 °C.	≤ 15 min pri sobni temp. ≤ 24 ur pri sobni temp.	Če odvajamo likvor v več epruvet, naj bo druga epruveta za mikrobiološke preiskave. Likvor se ne sme prenašati pri 4 °C. Pri sumu na gnojni meningitis odvajamo tudi kri za hemokulturo. Če je odvzem iz ventrikularne drenaže, to ustrezno označimo na spremnem listu za mikrobiološke preiskave.
Glive – kultivacija	3 ml	≤ 15 min pri sobni temp. ≤ 24 ur pri sobni temp.	Če ni mogoč enkratni odvzem navedene količine, se lahko likvor pridobi z večkratnimi punkcijami.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> – kultivacija	2–10 ml	≤ 2 uri pri sobni temp. ≤ 24 ur pri sobni temp.	Če ni mogoč enkratni odvzem navedene količine, se lahko likvor pridobi z večkratnimi punkcijami.
Bakterije – molekularni dokaz (brez kultivacije)	≥ 1 ml	≤ 2 uri pri sobni temp. ≤ 24 ur pri 4 °C	
Glive – kriptokokni antigen	≥ 2 ml	≤ 2 uri pri sobni temp. ≤ 24 ur pri 4 °C	
Glive – molekularni dokaz	≥ 2 ml	≤ 15 min pri sobni temp. ≤ 24 ur pri sobni temp.	
Borelije lajmske borelioze – izolacija	≥ 2 ml	≤ 2 uri pri sobni temp.	
Borelije lajmske borelioze – molekularni dokaz	≥ 2 ml	≤ 4 ure pri sobni temp. ≤ 24 ur pri 4 °C	
Borelije lajmske borelioze – dokaz intratekalne tvorbe protiteles	≥ 2 ml	≤ 4 ure pri sobni temp. ≤ 24 ur pri 4 °C	Vzorec likvorja mora biti odvzet v 2 do 3 urah po odvzemu krvi, vmes naj bolnik ne dobi infuzije/transfuzije.
Virusi – molekularni dokaz	≥ 1 ml	≤ 24 ur pri 4 °C > 24 ur pri –20 °C	
Atipični povzročitelji – molekularni dokaz	≥ 1 ml	≤ 24 ur pri 4 °C > 24 ur pri –20 °C	
Paraziti – molekularni dokaz	≥ 2 ml	≤ 2 uri pri sobni temp. ≤ 24 ur pri 4 °C	

vrsti kužnine ter datumu in uri odvzema. Epruveta s kužnino ne sme biti prepolna, mora biti nepropustna in varno zategnjena, na zunanji strani transportne posodice ne sme biti sledov polite kužnine. Pri odvzemu in prenosu kužnin za mikrobiološke preiskave moramo biti vedno pozorni na varnost preiskovanca, zdravstvenega delavca, kurirja in okolice: uporabimo zaščitna sredstva (rokavice, zaščitno haljo, po potrebi masko, očala ipd.) in upoštevamo zaščitne ukrepe po strokovnih navodilih.

ZAVRNITVENI KRITERIJI ZA MIKROBIOLOŠKO PREISKAVO LIKVORJA

Laboratorij kužnine, poslane na mikrobiološko preiskavo, zavrne, če:

- so neustrezno označene,
- so polite,
- so odvzete v neustrezno embalažo,
- je količina likvorja premajhna,
- je čas od odvzema kužnine do sprejema v laboratorij daljši od priporočenega,
- je kužnina prenesena v neustreznih in nenadzorovanih pogojih (npr. po pošti).

Zaradi invazivnosti in težavnosti odvzema likvorja lahko v izjemnih primerih laboratorij sprejme in analizira tudi likvorje, ki jih je premalo, so politi, pri katerih je čas od odvzema do sprejema v laboratorij prekoračen ali so pogoji shranjevanja in transporta neustrezni, toda takšen rezultat na izvidu vedno spremlja opozorilo, da obstaja možnost lažno negativnega rezultata zaradi premajhne količine vzorca, možnost kontaminacije vzorca pri politih vzorcih ali možnost lažno negativnega rezultata zaradi neustreznih pogojev transporta, pri čemer laboratorij ne jamči za verodostojnost rezultatov mikrobiološke preiskave. Pri interpretaciji rezultata mikrobiološke analize likvorja je vedno treba oceniti klinični pomen takšnega rezultata (lažno negativnega ali lažno pozitivnega).

VPLIVI NEUSTREZNEGA RAVNANJA Z LIKVORJEM NA REZULTATE MIKROBIOLOŠKIH PREISKAV

Mikrobiološki laboratorij ima vzpostavljene sisteme, s katerimi nadzoruje ali zmanjša možnost napak v analitični fazi obdelave kužnin. Najpogosteje so vzrok neustreznih mikrobioloških rezultatov napake, ki izvirajo iz predanalitične faze (odvzem, shranjevanje, transport) in so v veliki meri odvisne od naročnika preiskav.

V Tabeli 3 so navedeni najpogostejši vzroki, ki vodijo v neustrezne rezultate mikrobioloških preiskav likvorja, in njihove posledice. Neveljavnih rezultatov mikrobioloških preiskav laboratorij ne poroča, v primeru dvoma o veljavnosti rezultatov mikrobioloških preiskav ali neskladja z anamnezo, epidemiološkimi podatki in/ali kliničnim potekom bolezni ter rezultati drugih laboratorijskih preiskav je potreben posvet med laboratorijem in klinikom.

ZAKLJUČEK

Za natančno etiološko opredelitev okužb osrednjega živčevja je potrebna hitra in zanesljiva mikrobiološka diagnostika, ki vključuje širok nabor mikrobioloških preiskav. Poleg pravilne izbire preiskav in pravilnega odvzema likvorja je v predanalitični fazi nujno treba zagotoviti čim krajši čas od odvzema kužnine do inokulacije vzorca v ustrezno gojišče oziroma čim krajši čas prenosa vzorca v mikrobiološki laboratorij pod ustreznimi pogoji. Količina likvorja mora biti zadostna za vse naročene preiskave. Če je količina vzorca premajhna, je potreben posvet med kliničnim zdravnikom in kliničnimi mikrobiologi oziroma izbira prioritetenih preiskav. Izdelava in implementacija diagnostičnih algoritmov bi lahko izboljšali možnosti etiološke opredelitve povzročiteljev okužb osrednjega živčevja.

Tabela 3. Vzroki za neustrezne rezultate mikrobioloških analiz likvorja in posledice (6, 11, 12).

Problem	Vzrok	Posledica
Zakasnitev pri obdelavi likvorja	Shranjevanje kužnine čez noč Zakasnitev pri transportu Zakasnitev v obdelavi kužnine v laboratoriju	Razrast kontaminantov. Spremembe vrednosti pH v kužnini vplivajo na viabilnost mikroorganizmov.
Neustrezna temperatura shranjevanja in transporta kužnine	Neustrezno ravnanje z likvorjem v predanalitični fazi	Razrast kontaminantov. Spremembe vrednosti pH v kužnini vplivajo na viabilnost mikroorganizmov. Propad in razgradnja temperaturno občutljivih mikroorganizmov.
Prisotnost krvi v likvorju	Kri v likvorju ob lumbalni punkciji	Napačen rezultat (lažno negativen) molekularnih analiz, ker kri v molekularnih reakcijah deluje kot inhibitor.
Večkratno odmrzovanje in zamrzovanje	Potreba po retrospektivnem testiranju	Več kot 3 cikli odmrzovanja/zamrzovanja neugodno vplivajo na rezultat molekularnega testiranja.
Neustrezen volumen kužnine	Premajhen volumen kužnine za testiranje	Vseh zelenih preiskav ni mogoče opraviti. Lažno negativen rezultat preiskave (laboratorij zavrne testiranje ali ga v skrajnem primeru opravi, vendar ne zagotavlja korektnosti rezultata. V komentarju izvida je navedeno, ali je bila preiskava narejena iz manjšega volumna ali redčenega vzorca, in vpliv na rezultate analize).
Neustrezna transportna posodica	Integriteta vzorca med transportom ali med testiranjem ni zaščiten.	Zmanjšana občutljivost
Kultivacija – brez rasti	Antibiotična terapija pred odvzemom vzorca	Antibiotiki pred odvzemom vzorca vplivajo na viabilnost bakterij, kar vodi v neuspešno rast v kulturi; slabša občutljivost diagnostičnih testov.
Kultivacija – mešana rast	Shranjevanje kužnine čez noč Zakasnitev pri transportu Zakasnitev v obdelavi kužnine v laboratoriju Kontaminacija vzorca pri odvzemu	Razrast kontaminantov. Spremembe vrednosti pH v kužnini vplivajo na viabilnost mikroorganizmov. Likvor je kontaminiran z mikrobo floro kože.
Zamenjava vzorca	Neustrezno označevanje vzorcev	Kužnina bo zavrnjena in mikrobiološka analiza ne bo opravljena.
Izvedba nepravilnega testa	Nejasno označena preiskava na spremnem listu, neustrezna izbira pri elektronskem naročilu	Zamik pri testiranju. Zavrnitev testiranja. Kužnina je porabljena za neustrezno izbrano preiskavo, zato nadaljnja analiza ni možna.

LITERATURA

1. McComb JG. Recent research into the nature of cerebrospinal fluid formation and absorption. *J Neurosurg.* 1983;59(3):369–83.
2. Speake T, Whitwell C, Kajita H, Majid A, Brown PD. Mechanisms of CSF secretion by the choroid plexus. *Microsc Res Tech.* 2001;52c(1):49–59.
3. Wright BLC, Lai JTF & Sinclair AJ. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. *J Neurol.* 2012;259:1530–45.
4. Tomažič J. Pristop k bolniku z infekcijsko boleznijo. In: Tomažič J., Strle F. eds. Infekcijske bolezni. Ljubljana: Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo; 2017. p. 20.
5. Onkološki inštitut. Seznam preiskav in navdila naročnikom za pošiljanje vzorcev [internet]. Ljubljana [cited 2021 Jan 17]. Available from: <https://www.onko-i.si>.
6. Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo MF UL. Diagnostična dejavnost: Odvzem in transport vzorcev [cited 2023 Jun 26]. Available from: <https://imi.si/odvzem-in-transport-vzorcev>.
7. Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:208–36.
8. Gnann Jr. JW, Whitley RJ. Herpes Simplex encephalitis: an update. *Curr Infect Dis Rep.* 2017;19:13.
9. Wiedbrauk DL, Cunningham W. Stability of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid specimens. *Diagn Mol Pathol.* 1996;5:249–52.
10. Jerome KR, Huang ML, Wald A, Selke S, Corey L. Quantitative stability of DNA after extended storage of clinical specimens as determined by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2609–11.
11. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S at al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis.* 2018;67(6):1–94.
12. Univerzitetna klinika Golnik. Priporočila za odvzem in pošiljanje kužnin [internet]. Ljubljana [cited 2023 Jun 26]. Available from: <https://www.klinika-golnik.si/strokovna-javnost/laboratorij-za-mikobakterije>.

Vesna Cvitković Špik,¹ Tjaša Cerar Kišek,¹ Katja Strašek Smrdel,¹
Tina Triglav,¹ Eva Ružič Sabljic¹

Kaj moramo vedeti, preden pošljemo vzorec za molekularno mikrobiološko preiskavo

Specimen requirements for molecular microbiological diagnostics

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: molekularna mikrobiološka diagnostika, specifični PCR, širokospektralni PCR, predanalizna faza, stopenjska diagnostika

Uporaba molekularnih preiskav za neposredni dokaz povzročitelja v mikrobiološki diagnostiki infektivnih bolezni narašča. Vse pogosteje se iz posamezne kužnine, poleg prvotno naročene, naknadno opravljajo dodatne molekularne preiskave, zato je pri odvzemu treba upoštevati tudi določene strožje kriterije odvzema, prenosa in shranjevanja kužnine, saj številni dejavniki predanalizne faze vplivajo na rezultate.

V prispevku opisujemo vpliv najpomembnejših dejavnikov predanalizne faze na različne molekularne preiskave ter načine preprečevanja najpogostejših napak in njihovih posledic. Kontaminacija kužnine ob odvzemu lahko oteži interpretacijo rezultatov določenih preiskav; redčenje kužnine, premajhna količina kužnine, neustrezen prenos in shranjevanje lahko onemogočijo dokaz povzročitelja bolezni. Poznavanje postopkov in pravilna izvedba predanalizne faze sta pogoja za to, da z molekularnimi preiskavami dokažemo povzročitelja bolezni in da pravilno interpretiramo rezultate.

ABSTRACT

KEY WORDS: molecular microbiological diagnostics, specific PCR, broad-range PCR, pre-analytical phase, stepwise diagnostics

Molecular tests are increasingly used in the microbiological diagnostics of infectious diseases for the direct detection of the pathogen. Increasingly, molecular tests are being performed on a single specimen in addition to those initially ordered, necessitating the consideration of more stringent criteria for specimen collection, transport and storage, since the results are influenced by many factors in the preanalytical phase.

¹ Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana. Korespondenca/Correspondence: V. Cvitković Špik: vesna.cvitkovic-spik@mf.uni-lj.si

In the paper, we describe the influence of the most important factors of the preanalytical phase on various molecular tests and ways to avoid the most common errors and their consequences. Contamination of the specimen at the time of collection may complicate the interpretation of certain test results; dilution of the specimen, insufficient quantity of specimen, inadequate transport and storage, etc. may prevent the detection of the pathogen. Sound knowledge of the procedures and the correct performance of the preanalytical phase are prerequisite for the detection of the causative agent of the disease through molecular methods and the correct interpretation of the results.

UVOD

Molekularne preiskave uspešno uporabljamo za neposredno dokazovanje okužb s povzročitelji številnih infekcijskih bolezni, njihovo identifikacijo, kvantifikacijo in natančnejšo opredelitev, nabor različnih molekularnih testov pa se še povečuje (1, 2). V preteklih letih smo bili priča napredku molekularnih metod predvsem z avtomatizacijo procesa, povečanjem občutljivosti in specifičnosti, skrajšanjem časa do rezultata in zmanjšanjem morebitnih kontaminacij, torej v analizni fazi diagnostike (3). Pomemben vpliv na rezultate molekularne diagnostike pa ima tudi predanalizna faza: izbor vrste kužnine, čas in način odvzema ter količina kužnine. Vrsta embalaže ali transportnega gojišča, čas in temperatura prenosa v mikrobiološki laboratorij ter shranjevanje pred izvajanjem metode pomembno vplivajo na ohranitev kužnine in s tem tudi na kakovost ter količino nukleinskih kislin mikrobnih povzročiteljev v kužnini. Pravilna izvedba predanalizne faze je pogoj za to, da z molekularnimi preiskavami dokažemo povzročitelja bolezni in da pravilno interpretiramo rezultate (4). Z vse večjim prodiranjem molekularnih preiskav v mikrobiološko laboratorijsko diagnostiko se povečuje tudi pomen poznavanja prednosti in omejitev teh metod, kar omogoča pravilno interpretacijo rezultatov v povezavi s klinično sliko (5).

Kako in v kolikšni meri posamezni dejavniki predanalizne faze vplivajo na mole-

kularne mikrobiološke preiskave, je odvisno predvsem od značilnih lastnosti določene molekularne preiskave in od vrste okužbe ali bolezni, katere etiologijo dokazujemo, ter od vrste povzročitelja. Na tem temelji tudi izbor najustreznejše vrste kužnine in preiskave. V prispevku zato najprej opisujemo lastnosti osnovnih molekularnih preiskav, nadaljujemo s pregledom uporabe molekularnih preiskav za dokaz različnih skupin mikrobnih povzročiteljev, s poudarkom na bakterioloških, in nazadnje predstavimo vpliv najpomembnejših dejavnikov predanalizne faze na molekularne preiskave.

KAJ JE ZNAČILNO ZA OSNOVNE MOLEKULARNE MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE?

Molekularne mikrobiološke metode spadajo med metode neposrednega dokazovanja povzročiteljev bolezni. Omogočajo nam dokazovanje specifičnih tarčnih zaporedij nukleinskih kislin povzročiteljev (DNK, pri virusih tudi RNK) neposredno v bolnikovi kužnini. Molekula RNK je bolj občutljiva za razgradnjo, zato je treba upoštevati strožja navodila za prenos in shranjevanje kužnin, s čimer zmanjšamo možnost razgradnje molekul RNK v predanalizni fazi (4). Največkrat uporabljena metoda je verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), pri kateri pomnožujemo tarčno zaporedje nukleinske kisline, ki je značilno samo za določenega povzročitelja. Novejša različica, PCR v realnem času, omogoča hiter in

občutljiv dokaz enega (**vrstno specifičen PCR**) ali več povzročiteljev (**hkratni PCR**) (6, 7). Hkratni PCR v realnem času se uporablja predvsem pri sindromski diagnostiki, kjer dokazujemo najpogostejše bakterijske, virusne, glivne in/ali parazitske povzročitelje določene klinične slike, npr. pri mikrobiološki diagnostiki meningitisa, okužb dihal, okužb prebavil, septičnega artritisisa, sepse ipd. Hkratni PCR v realnem času odlikujejo visoka občutljivost in specifičnost ter razmeroma kratek čas do rezultata, najpomembnejša omejitev pa je vnaprej določen omejen nabor povzročiteljev (8).

V diagnostiki bakterijskih okužb se uporablja tudi **bakterijski širokospektralni PCR** oziroma evbakterijski PCR (angl. *broad-range 16S rDNA PCR*), ki nam teoretično omogoča dokaz in identifikacijo vseh bakterij. Metoda temelji na pomnoževanju ohranjene regije gena za 16S rRNK, določanju nukleotidnega zaporedja in njegovi primerjavi z zaporedji v genski banki (9, 10). Bakterijski širokospektralni PCR je primeren za opredelitev okužb primarno sterilnih mest, kjer pričakujemo enega povzročitelja. Preiskava je zelo občutljiva za kontaminacije (z okoljskimi bakterijami ali bakterijami normalne mikrobiote), zato so pravilen odvzem, prenos, shranjevanje in ravnanje s kužnino ter izvedba preiskave izrednega pomena za pravilen rezultat (4, 5).

KDAJ ZA NEPOSREDNI DOKAZ OKUŽBE Z DOLOČENIM MIKROBNIM POVZROČITELJEM UPORABIMO MOLEKULARNO PREISKAVO?

Molekularne metode nam omogočajo hiter in specifičen neposredni dokaz okužb s številnimi povzročitelji bolezni, vendar se je treba zavedati, da imajo tudi omejitve, zaradi katerih ne morejo nadomestiti ostalih metod.

Virusi

Za neposredno dokazovanje virusnih povzročiteljev so v vsakodnevni diagnostiki v uporabi molekularne metode, ki so večinoma nadomestile druge. Uporablja se za hitro opredelitev povzročitelja, za genotipizacijo, za določanje občutljivosti virusnega povzročitelja za protivirusna zdravila, za spremljanje učinkovitosti protivirusnega zdravljenja. Glavna in najpogosteje uporabljana metoda je specifični PCR v realnem času, ki je v primerjavi z dokazovanjem antigenov v kužnini, hibridizacijskimi metodami in elektronskim mikroskopiranjem bolj občutljiv in specifičen ter preprostejši in hitrejši od poskusa osamitve virusov v celični kulturi. Najpomembnejša omejitev specifičnega PCR v realnem času je, da ciljano iščemo samo posamezne povzročitelje, ki jih pričakujemo, in da rezultat ne vsebuje informacije o viabilnosti virusov (11).

Bakterije

V diagnostiki bakterijskih okužb molekularne metode ne morejo nadomestiti osamitve določenih povzročiteljev in fenotipskega določanja občutljivosti za antibiotike, zato se izvajajo dodatno ali sočasno s klasičnimi postopki kulture (1). Izjema je neposredno dokazovanje okužb z znotrajceličnimi bakterijami (klamidije, rikecije, anaplazme) in z nekultivabilnimi bakterijami (*Treponema pallidum*, *Tropheryma whippelii*), za kar so, podobno kot za viruse, uveljavljene molekularne metode (1, 12). Te je smiselno izvajati tudi za dokaz drugih bakterij, katerih kultivacija je zahtevna ali dolgotrajna, ali kadar potrebujemo zelo hitro opredelitev povzročitelja (8) oziroma če je kultivacija negativna zaradi predhodnega antibiotičnega zdravljenja bolnikov (8, 10).

Za neposredni dokaz bakterij, ki jih je težko gojiti ali je njihova kultivacija dolgotrajna, ker so zahtevne glede hranil ter

drugih pogojev za rast (*Mycobacterium tuberculosis* kompleks, mikoplazme, borelije, leptospire, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, anaplazme in druge), so molekularne preiskave bolj občutljive od dokazovanja antigenov povzročitelja ter mikroskopskega pregleda kužnine. V primerjavi s kultivacijo je molekularni dokaz bistveno hitrejši, kar je še zlasti pomembno v diagnostiki tuberkuloze (13), vendar manj občutljiv od kultivacije. Izjema so bakterije, ki v kužnini hitro propadejo (npr. *B. pertussis*) – zanje so molekularne metode bolj občutljive tudi od kultivacije (1), ki se kljub temu izvaja sočasno, saj omogoča izolacijo in s tem natančnejšo opredelitev povzročitelja, kar je pomembno za epidemiološke namene (14).

Hitra opredelitev povzročitelja je najpomembnejša pri hudih okužbah, npr. okužbah osrednjega živčevja (OŽ) ali sepsi. Sindromska diagnostika okužb OŽ je bila uspešno vpeljana v rutinsko laboratorijsko diagnostiko meningitisa in encefalitisa (15, 16), medtem ko se je sindromska diagnostika za dokaz najpogostejših povzročiteljev sepse izkazala za zelo drago in ima dodatno diagnostično vrednost le v zelo specifičnih kliničnih primerih (17). Za ta namen izvajamo hkratni PCR v realnem času.

V zadnjem času se molekularna sindromska diagnostika uporablja tudi za hitro dokaz najpogostejših povzročiteljev akutnega gastroenteritisa, pridobljenega v domačem okolju. Dodatna prednost je višja občutljivost od kultivacije za dokaz *Campylobacter* spp. in od ostalih metod za dokaz *Cryptosporidium* spp. in *Giardia* spp. (18). Zaradi visoke občutljivosti molekularnih metod za dokaz parazitov zadostuje en vzorec blata, medtem ko so pri mikroskopskem pregledu blata na parazite potrebni vsaj trije vzorci. Če molekularno dokažemo bakterijskega povzročitelja, vedno opravimo še kultivacijo, torej izvedemo še poskus klasične osamitve, identifikacije in določi-

tve občutljivosti za antibiotike. Če obstaja klinični sum na okužbo s *Clostridioides difficile*, z verotoksigeno *E. coli* ali drugimi dia-reogenimi sevi *E. coli*, je treba preiskave zaradi specifične laboratorijske diagnostike naročiti ločeno. Ob naročilu je treba zaradi razširjene usmerjene molekularne laboratorijske diagnostike navesti tudi morebitna potovanja bolnikov v endemske kraje oz. sum na redke povzročitelje (npr. *Entamoeba histolytica*) (19).

Predvsem zaradi krajšega časa do rezultata uporabljamo PCR v realnem času tudi za hitro odkrivanje nosilcev večkratno odpornih bakterijskih povzročiteljev, npr. sevov *Staphylococcus aureus*, odpornih proti meticilinu (angl. *methicillin-resistant S. aureus*, MRSA) v nadzornih kužninah (20). Ker z molekularno preiskavo dokažemo le zaporedje DNK, ki je specifično za MRSA, ne pa živih bakterij MRSA, preiskava ni primerna za ugotavljanje uspešnosti zdravljenja ali uspešnosti dekolonizacije bolnikov, ki so v zadnjem letu imeli okužbo z MRSA, potrjeno s kultivacijo, ker je pri njih lahko prisotna zgolj DNK MRSA, ne pa žive bakterije. To je primer preiskave, ki nazorno kaže, da je za pravilno interpretacijo rezultatov potrebno dobro poznavanje značilnosti in omejitev določene molekularne preiskave.

Za opredelitev bakterijskega povzročitelja v primerih, ko je kultivacija negativna, so molekularne metode bolj občutljive. Rezultat klasične kultivacije iz kužnine je lahko lažno negativen, ker so povzročitelji težko kultivabilne ali nekultivabilne bakterije, pogosteje pa zato, ker bakterije v kužnini niso več viabilne, npr. zaradi antibiotičnega zdravljenja pred odvzemanjem kužnine ali zaradi značilnosti nekaterih patogenih bakterij, ki sicer na standardnih bakterioloških gojiščih in pri standardnih pogojih rastejo, je pa kljub temu kultivacija za njihovo osamitev iz določenih vrst kužnin slabo občutljiva. Tak primer so bakterije *Streptococcus pneumoniae* (21, 22) in

bakterije *Kingella kingae* (23, 24), za katere imajo molekularne preiskave visoko dodatno diagnostično vrednost, zato je ob odvzemu treba zagotoviti del kužnine tudi za molekularne preiskave (4).

V laboratorijskem diagnostičnem postopku bakterijskih okužb je **smotrna stopnjska diagnostika**, ki se prične s kultivacijo, če ni rasti, pa se izvedejo dodatne molekularne preiskave.

Če obstaja sum na določenega povzročitelja, je optimalno izvesti molekularni dokaz z vrstno specifičnim PCR v realnem času. Pri bolnikih s simptomi, ki jih lahko povzroči več različnih patogenov, se lahko odločimo za hkratni PCR v sklopu sindromske diagnostike. Obe metodi sta hitri, visoko občutljivi in visoko specifični. Ob klinični sliki, ki vzbuja sum na redkejše povzročitelje, ali če povzročitelja ne dokažemo s specifičnimi PCR, je iz kužnine optimalno izvesti bakterijski širokospektralni PCR. Pogoj je, da gre za kužnino s primarno sterilnega mesta (22, 25). S to preiskavo lahko neposredno v kužnini teoretično dokažemo katera koli bakterijskega povzročitelja, je pa nekoliko slabše občutljiva in nekoliko dražja od specifičnega PCR (22). Bakterijski širokospektralni PCR je ob sumu na bakterijsko okužbo smotrno uporabljati:

- pri zelo prizadetem bolniku, zlasti če je imunsko oslavljen; ko etiologija zelo verjetne bakterijske okužbe ni opredeljena s standardnimi mikrobiološkimi postopki;
- pri bolniku, pri katerem je zaradi predvidenega dolgotrajnega antibiotičnega zdravljenja zelo pomembna vzročna opredelitev bakterijske okužbe (npr. infekcijski endokarditis, osteomielitis/spondilodiscitis, pljučni/možganski empiem/absces, endoftalmitis, mikotična anevrizma itd.);
- pri bolniku, pri katerem je bilo antibiotično zdravljenje uvedeno pred odvzemu kužnin;

- pri bolniku, pri katerem sumimo na povzročitelje, ki jih z običajnimi mikrobiološkimi metodami ne moremo dokazati (npr. *Tropheryma whippelii* itd.) oz. jih težko dokažemo (npr. anaerobne bakterije, za kultivacijo zahtevne bakterije) (10).

Pri stopnjski diagnostiki ima veliko vlogo dobra komunikacija med laboratorijem in kliniko. Specialistu mikrobiologu so pri izboru dodatnih molekularnih preiskav, ki jih lahko priporoči za dokaz potencialnega povzročitelja, v pomoč podatki o klinični sliki bolnika, diagnoza, terapija, potovanja, imunsko ali osnovno zdravstveno stanje bolnika (1).

Z molekularnimi metodami izvajamo tudi molekularni dokaz odpornosti bakterij neposredno v kužnini, vendar v zelo omejenem obsegu, npr. odpornost bakterij *Staphylococcus aureus* proti meticilinu (20), odpornost bakterij *Helicobacter pylori* proti klaritromicinu (26) idr.

Iz zgoraj navedenega opisa dopolnjevanja ali kombiniranja klasične mikrobiološke diagnostike z molekularno lahko povzamemo, da se posamezna kužnina pogosto razdeli za več različnih preiskav, zato je pri odvzemu treba upoštevati predvsem strožje kriterije glede aseptičnega odvzema kužnine, uporabe ustreznih pripomočkov in embalaže ter shranjevanja kužnine.

Glive

Za neposredni dokaz glivičnih povzročiteljev dodatno (poleg kulture, dokaza antigenov gliv, mikroskopskega pregleda kužnine) izvajamo molekularne metode predvsem za hitro visoko specifično in občutljivo diagnostiko invazivnih in sistemskih okužb z glivami *Candida* spp. in *Aspergillus* spp. (27–29) ter izbranih gliv v sklopu sindromske diagnostike za meningitis (8) in sepsa (30) ali za potrditev okužbe, npr. pljučnice, ki jo povzroči *Pneumocystis jirovecii*, pri imunsko oslavljenih bolnikih (1).

Paraziti

V neposredni diagnostiki parazitskih okužb se molekularne metode uporabljajo predvsem za hitro in specifično opredelitev povzročitelja pri sistemskih okužbah (malaria, lišmanioza, toksoplazmoza), pri driski (*Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp.) (18, 31) ter pri uretritisu, cistitisu ali cervicitisu (*Trichomonas vaginalis*). Uporabljajo se zlasti za hitrejši in visoko specifičen dokaz povzročitelja (1).

KAKO POSTOPKI V PREDANALIZNI FAZI VPLIVAJO NA REZULTAT MOLEKULARNE PREISKAVE V BAKTERIOLOGIJI?

Vsak diagnostični laboratorij ima izdelana in objavljena navodila za odvzem in transport kužnin za preiskave, ki jih izvaja (19, 32). Ti postopki izhajajo iz mednarodno veljavnih standardov (4) in v določenem obsegu iz navodil proizvajalca diagnostičnih testnih kompletov. Laboratorij jih preizkuša za vsako vrsto kužnine, iz katere se izvaja določena preiskava (19, 32).

Pred odvzemom kužnine je treba razmisliti o najverjetnejših povzročiteljih okužbe glede na klinične znake in izbrati ustrezen nabor preiskav za diagnostiko, po potrebi stopenjsko. Odvisno od izbrane preiskave odzamemo primerne kužnine na ustrezen, v diagnostičnem laboratoriju opredeljen način in ob pravem času, ki je praviloma ob izraženih kliničnih znakih ali čim hitreje po nastopu kliničnih znakov. Upoštevamo, da bo morda treba opraviti dodatne, med drugim tudi občutljivejše molekularne mikrobiološke preiskave, zato se držimo strožjih pravil odvzema, nekaj nativne kužnine lahko tudi shranimo ali vzorec odzamemo v dvojniku, če je potrebno shranjevanje kužnine v transportnem gojišču. Npr. za laboratorijsko diagnostiko septičnega artritisa pri majhnih otrocih, ki ga povzroči *Kingella kingae*, je najbolj občutljivejša metoda specifični PCR (23, 24). Ker je

količina punktata sklepa pri teh bolnikih običajno majhna, je priporočljivo, da se vsaj del kužnine nameni molekularni preiskavi tako, da se po inokulaciji v gojišče za hemokulturo (hemokulturno stekleničko) del kužnine zadrži v brizgi, s katero se punktira.

Zelo pomembno je, da se dosledno upoštevajo navodila laboratorija, ki izvaja določeno preiskavo, saj so nekatere molekularne metode zelo občutljive za predanalizno fazo, predvsem za kontaminacijo ali redčenje kužnine, uporabo neustrezne embalaže z neustreznimi dodatki ter prenos in shranjevanje pri neustreznih pogojih. Navodila za molekularni dokaz okužb z virusi, klamidijami, drugimi znotrajceličnimi bakterijami in nekultivabilnimi bakterijami so že uveljavljena. Predvsem za kužnine, ki si jih deli več laboratorijev oz. so namenjene tako kultivaciji kot molekularnim preiskavam ali več različnim molekularnim preiskavam, se povečuje potreba po dodatnih priporočilih in navodilih za pravilen odvzem, prenos in shranjevanje. V Tabeli 1 smo zbrali podatke o posebnostih odvzema, prenosa in shranjevanja izbranih kužnin za molekularne preiskave in posledice najpogostejših napak, ki jih opisujemo v nadaljevanju.

Najprej izpostavljam **preprečevanje kontaminacije primarno sterilnih kužnin** (likvor, plevralni punktati, punktati sklepa ipd.), ki ima največji vpliv na bakterijski širokospektralni PCR oziroma evbakterijski PCR, lahko pa jo zaznamo tudi z določenimi vrstno specifičnimi PCR-testi. Kontaminacijo v predanalizni fazi preprečimo tako, da kužnine s primarno sterilnih mest odzamemo na strogo aseptičen način, z velikim poudarkom na temeljiti pripravi sterilnega mesta za punkcijo primarno sterilne kužnine. Odvzem prek katetra ali shunta je neustrezen. V laboratorij pošljemo čim bolj intaktno nativno kužnino, v predpisani sterilni transportni embalaži, ki ne pušča, brez transportnega gojišča, nerazredčeno, brez izpostavljanja kontaminantom z nepotreb-

nim odpiranjem v nečistem prostoru (4). Z bakterijskim širokospektralnim PCR zaznamo poleg ali celo namesto patogena tudi kontaminante, ki lahko prikrijejo patogen v kužnini, če ga je manj kot kontaminantov. Kontaminacija lahko zelo oteži interpretacijo rezultatov, še zlasti pri imunsko oslabljenih bolnikih, pri katerih invazivne bolezni lahko povzročajo oportunistične ali okoljske bakterije. Vzrok za tovrstne rezultate je nepravilen način odvzema kužnine, ki ni strogo aseptičen; izvor kontaminantov pa je mikrobiota kože ali sluznic bolnika ter okolje, v katerem poteka odvzem. Pripomočki za odvzem, transportna embalaža, transportno gojišče, fiziološka raztopina, s katero je prelita kužnina (4), so sicer sterilni, a so na ali v njih lahko prisotni ostanki DNK, ki jih zaznamo z molekularnimi metodami (niso *DNA-free*). Npr. gojišče za hemokulturo dokazano vsebuje ostanke bakterijske DNK, ki jih zaznamo z bakterijskim širokospektralnim PCR, zato je kri ali druga vrsta kužnine, zasejana v gojišču za hemokulturo, neustrezna za preiskavo z bakterijskim širokospektralnim PCR (33). Ustrezna kužnina je 2–4 ml krvi, odvzete na strogo aseptičen način, v epruveto z antikoagulantom EDTA, ob pravem času, ko bolnik kaže znake sepse. Antikoagulant EDTA preprečuje koagulacijo krvi in zavira delovanje DNaz, s čimer se boljše ohranijo nukleinske kisline v kužnini (34). Nasprotno pa antikoagulant heparin zavira reakcijo PCR in ima negativen učinek na molekularne preiskave, zato epruvete s heparinom niso primerne za kužnine, namenjene molekularnim preiskavam (4).

Naslednji dejavnik iz predanalizne faze, ki ga izpostavljam, je **preprečevanje redčenja kužnine**. Kužnine ne prelivamo ali redčimo s fiziološko raztopino oziroma z drugimi tekočinami ali gojišči. Poleg zgoraj opisane problematike s kontaminacijo je redčenje kužnine s tekočinami ali gojiščem neustrezno tudi zato, ker na ta način razredčimo povzročitelje ali DNK povzroči-

telja, s tem pa zmanjšamo možnost dokaza patogena v kužnini (4).

Prav tako je rezultat izbrane preiskave lahko lažno negativen, kadar je kužnine premalo (zlasti ob naročenih številnih preiskavah) (Tabela 1). V tem primeru diagnostični laboratorij obvesti naročnika, da se dogovorita o naboru in zaporedju potrebnih preiskav, torej stopenjski diagnostiki, in/ali na izvid doda opombo.

Ustrezen prenos in shranjevanje kužnin za molekularne bakteriološke preiskave je pri 4 °C. Pogosto je količina kužnine omejena in jo je na odvzemnem mestu težko aseptično razdeliti na ustrezne odmerke ter s tem zagotoviti zahtevane pogoje prenosa za različne preiskave. Nativna kužnina se zato pošilja v eni embalaži, iz katere jo v mikrobiološkem laboratoriju odvezamemo posebej za kultivacijo in posebej za molekularne preiskave. V tem primeru upoštevamo pogoje prenosa in shranjevanja, ki so predpisani za kultivacijo, torej do 2 uri pri sobni temperaturi, dlje pa pri 4 °C (19).

Če ugotovimo, da so bili odvzem, transport in/ali shranjevanje kužnine neprimerni za izbrano diagnostično metodo, a je preiskava kljub temu potrebna, se v pogovoru s specialistom klinične mikrobiologije v diagnostičnem laboratoriju opredeli smiselnost preiskave (1).

ZAKLJUČEK

V sodobnem času je z novejšimi, hitrejšimi, občutljivejšimi in bolj specifičnimi molekularnimi metodami diagnostika okužb s patogenimi mikroorganizmi zelo napredovala. Z naraščanjem števila diagnostičnih metod se pojavljajo vprašanja o njihovi dodatni diagnostični vrednosti v diagnostiki infekcijskih bolezni. Ker ni vsaka metoda primerna za vsako kužnino, je izbor ustrezne diagnostične metode (ali več metod) ključnega pomena. Dobljene rezultate preiskav je treba interpretirati upoštevajoč značilnosti izbrane pre-

Tabela 1. Posebnosti odvzema, prenosa in shranjevanja izbranih kužnin za molekularne preiskave, najpogostejše napake in posledice.

Kužnina	Način odvzema	Količina vzorca	Embalaža
Tekočine iz primarno sterilnih mest: likvor, plevralna tekočina, sklepna tekočina, prekatna vodka, vsebina gnojne kolekcije	Striktno aseptični pogoji odvzema	500 µl–1 ml nativne kužnine	Sterilna epruveta z navojem Sterilna brizga z zamaškom z navojem, s katero se tekočina punktura Sterilna posodica
Kužnine iz spodnjih dihal: bronhoalveolarni izpirek, izpirek bronha, aspirat bronha	Striktno aseptični pogoji odvzema	1 ml	Sterilna posodica
Polna kri	Striktno aseptični pogoji odvzema; vakuumski odvzem; ob pravem času po navodilih za odvzem hemokulture	3–5 ml	Vakuumska epruveta z dodanim antikoagulantom EDTA
Tkivo	Striktno aseptični pogoji odvzema	Vsaj 1 g nativnega tkiva	Sterilna posodica z navojem
Blato	Odvzem v čisto posodico za blato z žličko; primerno tudi povsem tekoče blato; odvzem čimprej po pojavitvi bolezni	3–5 ml nativnega blata ali do 1/3 posodice Krtačni bris	Posodica z žličko Transportno gojišče Cary-Blair

Legenda: ^a lokalni transport, ^b daljši transport, ST – sobna temperatura

Prenos kužnine	Možna napaka	Posledica napake
<p>Tudi za kulturo: ≤ 2 uri^a ST, ≤ 24 ur^b 4 °C</p> <p>Samo za molekularne preiskave: - za bakterije, glive in DNK-viruse: ≤ 2 uri 4°C, ≤ 24 ur 4 °C - za RNK-viruse: tako po odvzemu ohladiti na ledu, ≤2 uri na ledu, dlje -20 °C</p>	<p>Kontaminacija med odvzemu zaradi neupoštevanja striktno aseptičnih pogojev, inokulacije kužnine v gojišče za hemokulturo ali redčenja kužnine s fiziološko raztopino oziroma drugo sterilno tekočino, ki lahko vsebuje kontaminante</p>	<p>Otežena ali onemogočena interpretacija rezultata: kontaminante prekrijejo signal patogena, ki ga zato ni mogoče dokazati.</p> <p>Zaradi redčenja kužnine je zmožnost molekularnega dokaza povzročitelja znatno nižja in rezultat je lahko lažno negativen.</p>
	Nezadostna količina kužnine	Zmožnost molekularnega dokaza povzročitelja je nižja in rezultat je lahko lažno negativen.
<p>Tudi za kulturo: ≤ 2 uri ST, ≤ 24 ur 4 °C</p> <p>Samo za molekularne preiskave: ≤ 2 uri 4°C, ≤ 24 ur 4 °C</p>	<p>Kontaminacija med odvzemu zaradi neupoštevanja striktno aseptičnih pogojev, nepravilnega načina odvzema ali redčenja kužnine s fiziološko raztopino oziroma drugo sterilno tekočino, ki lahko vsebuje kontaminante</p>	<p>Otežena ali onemogočena interpretacija rezultata: kontaminante prekrijejo signal patogena, ki ga zato ni mogoče dokazati.</p> <p>Zaradi redčenja kužnine je zmožnost molekularnega dokaza povzročitelja znatno nižja in rezultat je lahko lažno negativen.</p>
	Nezadostna količina kužnine	Zmožnost molekularnega dokaza povzročitelja je nižja in rezultat je lahko lažno negativen.
<p>≤ 2 uri 4 °C, ≤ 24 ur 4 °C</p>	<p>Kontaminacija ob odvzemu zaradi neupoštevanja striktno aseptičnih pogojev ali inokulacije kužnine v gojišče za hemokulturo</p>	<p>Otežena ali onemogočena interpretacija rezultata: kontaminante prekrijejo signal patogena, ki ga zato ni mogoče dokazati.</p>
	Polna kri za molekularni dokaz povzročitelja sepse ni odvzeta ob pravem času, torej ko ima bolnik klinične znake sepse.	Povzročitelja ni mogoče dokazati, ker ga ni več v krvnem obtoku.
<p>Tudi za kulturo: ≤2 uri ST, ≤24 ur 4 °C</p> <p>Samo za molekularne preiskave: ≤ 2 uri 4°C, ≤ 24 ur 4 °C</p>	<p>Kontaminacija ob odvzemu zaradi neupoštevanja striktno aseptičnih pogojev ali stika tkiva z bombažno gazo v embalaži</p>	<p>Otežena ali onemogočena interpretacija rezultata: kontaminante prekrijejo signal patogena, ki ga zato ni mogoče dokazati.</p>
	Prelitje tkiva s fiziološko raztopino ali drugo sterilno tekočino, ki lahko vsebuje kontaminante	Otežena ali onemogočena interpretacija rezultata: kontaminante prekrijejo signal patogena, ki ga zato ni možno dokazati. Če je eden ali več koščkov tkiva prelitih z veliko količino tekočine v veliki embalaži, se kužnina lahko izgubi in rezultat je lahko lažno negativen.
<p>Tudi za kulturo: ≤ 2 uri ST, ≤ 24 ur 4°C</p>	<p>Kontaminacija v primeru odvzema iz straniščne školjke</p>	Otežena ali onemogočena interpretacija rezultata
<p>Samo za molekularne preiskave: ≤ 2 uri 4°C, ≤ 24 ur 4 °C</p>	<p>Nezadostna količina kužnine v diagnostiki bakterijskih povzročiteljev</p>	Otežena in pogosto neuspešna kultivacija bakterije kljub molekularnemu dokazu

iskave skupaj s klinično sliko bolnika. Z napredkom molekularne diagnostike in zaradi vse večjega nabora možnih preiskav se povečuje tudi potreba po dodatnih priporočilih in navodilih za pravilen odvzem, vrsto embalaže, količino, pogoje prenosa v mikrobiološki laboratorij in shranjevanje kužnin. Z upoštevanjem vseh pravil predanalizne faze se izognemo lažno negativnim kot tudi lažno pozitivnim ali pa težko interpretabilnim rezultatom. Priporočamo, da se, če je le mogoče, preiskave izvaja-

jo stopenjsko v izogib nepotrebni podvajanju rezultatov in večjim stroškom. Ob neprimernem ravnanju s kužnino ali pre-majhni količini kužnine je zelo pomemben posvet s specialistom klinične mikrobiologije. Nasvet specialista pogosto pomaga pri razreševanju zapletenih diagnostičnih težav, dodatni podatki o bolniku na spremnem listu kužnine, ki ga posreduje klinika, pa so zelo dobrodošli, saj že v analizni fazi usmerjajo diagnostične laboratorijske procese.

LITERATURA

1. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis*. 2018;67(6):e1–e94.
2. EVANS JV. Automation and molecular diagnostics: A new era in clinical microbiology. American Society for Clinical Laboratory Science. 2020:ascls.119.001883.
3. Fairfax MR, Bluth MH, Salimnia H. Diagnostic molecular microbiology: A 2018 snapshot. *Clin Lab Med*. 2018;38(2):253–76.
4. CLSI. Collection, transport, preparation, and storage of specimens for molecular methods. CLSI guideline mm13. 2nd ed. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
5. CLSI. Molecular diagnostic methods for infectious diseases. CLSI report mm03. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
6. Molecular microbiology: Diagnostic principles and practice. 3rd ed. ed. Persing DH, ed. Washington, DC: ASM Press; 2016.
7. Dunbar S, Das S. Amplification chemistries in clinical virology. *J Clin Virol*. 2019;115:18–31.
8. Ramanan P, Bryson AL, Binnicker MJ, et al. Syndromic panel-based testing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(1).
9. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16s rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol*. 2003;52(Pt 8):685–91.
10. Lužnik Z, Cerar T, Ruzic Sabljic E, et al. Eu-bacterial PCR – the usefulness of a molecular method in clinical practice. *Zdravniški Vestnik*. 2015;84:688–93.
11. Cobo F. Application of molecular diagnostic techniques for viral testing. *Open Virol J*. 2012;6:104–14.
12. Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30Suppl1:S7–15.
13. Migliori GB, Tiberi S, Zumla A, et al. MDR/XDR-TB management of patients and contacts: Challenges facing the new decade. The 2020 clinical update by the global tuberculosis network. *Int J Infect Dis*. 2020;92S:S15–S25.
14. Kastrin T, Barkoff AM, Paragi M, et al. High prevalence of currently circulating *Bordetella pertussis* isolates not producing vaccine antigen pertactin in Slovenia. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(2):258–60.
15. Wagner K, Springer B, Pires VP, et al. Pathogen identification by multiplex lightmix real-time PCR assay in patients with meningitis and culture-negative cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol*. 2018;56(2).
16. Vetter P, Schibler M, Herrmann JL, et al. Diagnostic challenges of central nervous system infection: Extensive multiplex panels versus stepwise guided approach. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(6):706–12.
17. Samuel L. Direct detection of pathogens in bloodstream during sepsis: Are we there yet? *J Appl Lab Med*. 2019;3(4):631–42.
18. McAuliffe GN, Anderson TP, Stevens M, et al. Systematic application of multiplex PCR enhances the detection of bacteria, parasites, and viruses in stool samples. *J Infect*. 2013;67(2):122–9.

19. Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo MF UL. Splošna navodila za odvzem in transport vzorcev za mikrobiološke preiskave [cited 20 Sep 2021]. Available from: http://www.imi.si/dokumenti/N_BMK_SPL_1_ODVZEM_TRANSPORT_Zunanji.pdf.
20. Polisen J, Chen S, Cimon K, et al. Clinical effectiveness of rapid tests for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitalized patients: A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2011;11:336.
21. Franchetti L, Schumann DM, Tamm M, et al. Multiplex bacterial polymerase chain reaction in a cohort of patients with pleural effusion. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):99.
22. Aggarwal D, Kanitkar T, Narouz M, et al. Clinical utility and cost-effectiveness of bacterial 16s rRNA and targeted PCR based diagnostic testing in a UK microbiology laboratory network. *Sci Rep.* 2020;10(1):7965.
23. Yagupsky P. Diagnosing *Kingella kingae* infections in infants and young children. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017;15(10):925–34.
24. Villani MC, Hamilton EC, Klosterman MM, et al. Primary septic arthritis among children 6 to 48 months of age: Implications for PCR acquisition and empiric antimicrobial selection. *J Pediatr Orthop.* 2021;4 (3):190–6.
25. Marbjerg LH, Holzknicht BJ, Dargis R, et al. Commercial bacterial and fungal broad-range PCR (Micro-Dx) used on culture-negative specimens from normally sterile sites: Diagnostic value and implications for antimicrobial treatment. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020;97(2):115028.
26. Dore MP, Pes GM. What is new in *Helicobacter pylori* diagnosis. An overview. *J Clin Med.* 2021;10(10).
27. White PL, Price JS, Cordey A, et al. Molecular diagnosis of yeast infections. *Curr Fungal Infect Rep.* 2021:1–14.
28. Ullmann AJ, Aguado JM, Arian-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: Executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24Suppl1:e1–e38.
29. Martin-Loeches I, Antonelli M, Cuenca-Estrella M, et al. ESICM/ESCMID task force on practical management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2019;45(6):789–805.
30. Mylonakis E, Clancy CJ, Ostrosky-Zeichner L, et al. T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: A clinical trial. *Clin Infect Dis.* 2015;60(6):892–9.
31. van Lieshout L, Roestenberg M. Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(6):520–8.
32. Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano. Odvzem in transport vzorcev za molekularne preiskave. 2019. Available from: <https://www.nlzoh.si/storitve/medicinska-mikrobiologija/nase-preiskave/molekularne-preiskave/>.
33. Fredricks DN, Relman DA. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. *Journal of Clinical Microbiology.* 1998;36(10):2810–6.
34. Barra GB, Santa Rita TH, de Almeida Vasques J, et al. EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clin Biochem.* 2015;48(15):976–81.

Petra Schollmayer,¹ Ivana Velimirović,² Katja Matović,¹ Tina Triglav,² Xhevat Lumi,¹ Nataša Vidović Valentinčič,¹ Zala Lužnik Marzidovšek¹

ODVZEM KUŽNIN PRI OKUŽBAH V OFTALMOLOGIJI

Collection of specimens in ophthalmologic infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: očesna okužba, keratitis, diagnoza, bakterije, glive, virusi, paraziti

Okužbe očesne površine in periokularnih tkiv so v vsakdanji oftalmološki praksi razmeroma pogoste, njihova klinična slika pa marsikdaj ni specifična za določen mikroorganizem. Za natančnejšo etiološko opredelitev se tako pogosto zatekamo k odvzemu kužnin, kot so bris roba veke, očesne veznice, postržek roženice ali bris ulcerirane solzne vrečke. Pravočasen in pravilen odvzem kužnin je še zlasti pomemben pri zdravljenju znotrajočesnih okužb, ki v oftalmologiji veljajo za vid ogrožajoča in urgentna stanja. V prispevku bomo tako natančno predstavili vrste kužnin v oftalmologiji, njihove posebnosti, pravilen odvzem in transport kužnin ter njihov pomen v klinični praksi.

ABSTRACT

KEY WORDS: ocular infection, keratitis, diagnosis, bacterial, fungal, viral, parasitic

Infections of the ocular surface and periocular tissues are relatively common in everyday ophthalmic practice, and their clinical presentation is often not specific of a particular pathogen. For a more precise etiological characterisation of these infections, we often collect ocular specimens such as swabs from the edge of the eyelid, conjunctival swab, corneal scraping, or swab of the ulcerated lacrimal sac. Moreover, timely and correct collection of intraocular specimens is of particular importance for the correct treatment of intraocular infections, which are vision-threatening and an ophthalmic emergency. In this paper, we will present a detailed description of different types of ophthalmic specimens, the correct collection and transport methods, and their importance in clinical practice.

¹ Očesna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Grablovičeva ulica 46, 1000 Ljubljana

² Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Okužbe v oftalmologiji, predvsem okužbe očesne površine, so razmeroma pogoste (1). Glede na lokacijo jih lahko razdelimo na okužbe očesne površine in okužbe znotraj očesnih struktur. Med okužbe očesne površine uvrščamo okužbe vek in periorbitalnega tkiva, veznice in površine roženice, torej tkiv, ki so v stiku z okolico in imajo lahko komenzalno mikrobiološko floro. Znotraj očesne okužbe nastanejo, kadar mikroorganizmi intraoperativno, ob poškodbi ali hematogeno preidejo očesno steno in okužijo strukture znotraj očesa, ki so sicer sterilne (2). Znotraj očesne okužbe in fulminantno potekajoče okužbe očesne stene, ki lahko napredujejo v okužbo znotraj očesnih struktur, so vid ogrožajoča in v oftalmologiji urgentna stanja, zato takoj po odvzemu kužnin začnemo empirično protimikrobno zdravljenje. Klinična slika očesnih okužb pogosto ni specifična za določen mikroorganizem, hkrati pa je možen zelo širok spekter povzročiteljev (bakterije, virusi, glive, paraziti) (Tabela 1) (3). Za natančnejšo etiološko opredelitev se tako pogosto zatekamo k odvzemu različnih vrst kužnin. Mikrobiološki laboratoriji imajo izdelana navodila za odvzem in prenos kužnin, ki izhajajo iz mednarodno veljavnih standardov (4–6). Zlati standard za dokazovanje bakterijskih in glivnih povzročiteljev okužb je še vedno kultura in identifikacija povzročitelja, za dokazovanje virusnih povzročiteljev okužb in nekaterih parazitov pa se uporabljajo molekularne metode, kot je verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR). Molekularno dokazovanje bakterijskih povzročiteljev okužb pride v poštev ob neuspešni kultivaciji ali ob uvedeni antibiotični terapiji pred odvzemu kužnin. Natančna etiološka opredelitev nam omogoča učinkovito in bolj usmerjeno protimikrobno terapijo. V prispevku bomo tako natančno predstavili vrste kužnin v oftal-

mologiji in njihove posebnosti, pravilen odvzem in prenos kužnin ter njihov pomen v klinični praksi.

POSEBNOSTI KUŽNIN V OFTALMOLOGIJI

Očesna površina je v stiku z zunanjim okoljem in predstavlja zaščitno bariero globljih očesnih struktur. Očesna površina ni sterilna. Pogostejši komenzalni mikroorganizmi, ki jih lahko najdemo v majhnem številu na očesni veznici (ne pa iz postržka roženice), so bakterije iz rodu *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium* (predhodno *Propionibacterium*). Prehodno pa lahko očesno veznico kolonizirajo tudi patogene bakterije (npr. *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, bakterije iz rodu *Klebsiella*, *Moraxella*) in glive (1, 2). Zato je potrebna posebna previdnost pri interpretaciji rezultatov mikrobioloških analiz, ki se nanašajo na vzorce, odvzete z očesne površine, in upoštevanje ustrezne klinične korelacije.

Po drugi strani pa so roženica in intraokularna tkiva, npr. prekatna vodka ali steklovina, sterilni (2). V homeostatskih pogojih je notranjost očesa tudi imunsko privilegirana, kar pomeni, da se vzdružujejo imunološki mehanizmi tolerance, ki preprečujejo razvoj vnetja in procesov brazgotinjenja, ki bi lahko ogrozili vid (7). Vdor mikroorganizmov v oko poruši to ravnovesje, (čezmerni) vnetni odgovor pa lahko nepovratno okvari delovanje različnih struktur očesa (2).

Posebnost vzorcev, odvzetih v oftalmologiji, je tudi majhna količina materiala (tkiva), ki ga lahko pridobimo (0,1–0,5 ml), in s tem tudi pogosto majhno število mikroorganizmov v kužnini (1). Ponoven odvzem invazivno odvzetih vzorcev večina ni mogoč. Za invazivno odvzete vzorce se priporoča uporaba tekočih gojišč in zasajevanje neposredno ob bolniku.

Probleme lahko povzroči tudi predhodno lokalno uvedena empirična protimi-

krobnna terapija, zaradi katere lahko kužnina vsebuje nežive mikroorganizme (1). Povzročitelji so lahko na zunanje vplive bolj občutljivi ali pa gre za zelo počasi rastoče mikroorganizme (npr. mikobakterije), ki morda zahtevajo posebna gojišča, prenos ter pogoje kultivacije in izolacije.

V Tabeli 1 povzemamo najpomembnejše povzročitelje očesnih okužb, ki jih glede na lokacijo delimo na okužbe primarno nesterilnih mest (skupina 1) in okužbe primarno sterilnih mest (skupina 2).

ODVZEM KUŽNIN IZ SKUPINE 1: PRIMARNO NESTERILNO ODVZEMNO MESTO

Pri sumu na bakterijske povzročitelje ali glive vzorec odvezamo z brisom z bombažno konico, ki ga vstavimo v Amies/Stuartovo transportno gojišče. Prenos vzorca naj bo opravljen v čim krajšem času po odvzemu, optimalno v dveh urah pri sobni temperaturi oz. največ 24 ur pri sobni temperaturi pri daljšem transportu. Priporočila se odvzem vzorcev z obeh oces, tudi če

Tabela 1. Očesne okužbe in najpomembnejši povzročitelji (3, 8–13).

	Vnetje	Pomembni infektivni povzročitelji
Skupina 1 – primarno nesterilno mesto	Kanalikulitis Dakriocistitis	<i>Actinomyces</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., HSV, VZV, <i>Staphylococcus aureus</i> , betahemolitični streptokoki, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Blefaritis	<i>S. aureus</i> , HSV, VZV, HPV, virus <i>Molluscum contagiosum</i> , <i>Demodex</i> spp.
	Konjunktivitis	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Moraxella</i> spp., <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , enterobakterije, adenovirusi, HSV, VZV
	Keratitis	<i>S. aureus</i> , KNS, <i>S. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Haemophilus</i> spp., HSV, VZV, <i>Acanthamoeba</i> spp.
Skupina 2 – sterilno mesto	Uveitis, retinitis	HSV, VZV, CMV, <i>Treponema pallidum</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Toxocara canis</i> , <i>Candida</i> spp.
	Endoftalmitis, Panoftalmitis	KNS, <i>S. aureus</i> , betahemolitični streptokoki, <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. salivarius</i> , po Gramu negativne bakterije (<i>P. aeruginosa</i> , <i>H. influenzae</i>), <i>Cutibacterium acnes</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., glive (<i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.)
	Preseptalni in orbitalni celulitis	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , anaerobi, HSV, VZV, <i>Mucor</i> spp.

Legenda: HSV: herpes simplex virus, VZV: varicella-zoster virus, CMV: citomegalovirus, HPV: humani papiloma virus, KNS: koagulazno negativni stafilokoki

je prizadeto le eno. Za vsako oko uporabimo poseben bris.

Pri sumu na atipične bakterijske povzročitelje (npr. klamidija) je svetovan odvzem brisa pred aplikacijo lokalnega anestetika, da preprečimo njegov inhibični vpliv na dokazovanje povzročiteljev. Ker so klamidije znotrajcelične bakterije, je potrebno z brisom zajeti čim več okuženih celic, torej odločno obrisati odvzemno mesto. Bris (dakronska/krtlačna ščetka) vstavimo v ustrezno transportno gojišče za klamidije, ga odrežemo in epruveto tesno zapremo. Transport naj traja optimalno do 2 uri na sobni temp. oz. največ 24 ur pri 4 °C na večjih razdaljah (5). Če je potreben odvzem tako za preiskave na patogene bakterije kot tudi na klamidije, odvezamemo najprej bris na patogene bakterije in zatem bris na *C. trachomatis*.

Tudi pri sumu na virusne povzročitelje svetujemo odvzem brisa pred aplikacijo lokalnega anestetika. Nato bris potopimo v plastično epruveto z 2–3 ml transportnega gojišča za viruse.

Prenos naj traja do 2 uri pri sobni temperaturi oz. največ 24 ur pri 4 °C (4, 6). Pomembno je vedeti, da brisov, ki so poslani v transportnem gojišču za viruse, ne moremo uporabiti za preiskavo na patogene bakterije, saj ta gojišča vsebujejo antibiotike.

ODVZEM KUŽNIN IZ SKUPINE 2: PRIMARNO STERILNO ODVZEMNO MESTO

Postržek roženice damo v transportno gojišče ali bakteriološka in/ali mikološka gojišča. Vzorce steklovine in prekatne vodke prenesemo v mikrobiološki laboratorij direktno v brizgi ali v tekočem gojišču. Vzorce tkiva, biopsijske vzorce, kontaktne leče in tujke vstavimo v sterilno posodico in ustrezno navlažimo s sterilno fiziološko raztopino. Na bakteriološka in/ali mikološka gojišča, ki jih zagotovi mikrobiološki laboratorij, se vzorce zaseje, če je zdra-

vstveno osebje ustrezno usposobljeno in je to tehnično izvedljivo.

Pred uporabo je treba preveriti rok trajanja gojišč. Če uporabimo transportno gojišče za preiskavo na bakterije in/ali glive, vzorce prenašamo pri sobni temperaturi v čim krajšem času po odvzemu, optimalno v dveh urah, oz. največ 24 ur pri daljšem transportu. Za vzorce v sterilni fiziološki raztopini ali vzorce, zasejane neposredno na bakteriološka in mikološka gojišča, je priporočen čas transporta do 2 uri pri sobni temperaturi.

Če je kultivacija neuspešna ali če je bolnik pred odvzemom kužnin že prejel antibiotično terapijo, se lahko za diagnostiko bakterijskih okužb uporabi tudi širokospektralni PCR (angl. *broad-range 16S rDNA PCR*). Metoda, poimenovana tudi evbakterijski PCR, temelji na pomnoževanju gena za 16S rRNK, ki predstavlja ohranjeno regijo, sledi določanje nukleotidnega zaporedja pomnoženega odseka in njegova primerjava z bazo podatkov v genski banki (14, 15). Ker je preiskava izredno občutljiva za kontaminacije (normalna mikrobiota ali okoljske bakterije, ki lahko prekrijejo signal patogene bakterije v vzorcu), je primerna le za primarno sterilne kužnine (Skupina 2).

Pri sumu na virusne povzročitelje se vzorec hrani pri 4 °C, prenos pa opravi v največ 24 urah.

Pri sumu na akantamebni keratitis je zaradi priprave specialnega gojišča PAGE z nacepljeno *E. coli* za kultivacijo akantameb nujno treba vnaprej obvestiti Laboratorij za parazitologijo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI), in sicer en dan pred pošiljanjem vzorca. Gojišče PAGE pripravijo na IMI in ga pošljejo na kliniko. Odvzet postržek roženice zasejemo neposredno v pripravljeno gojišče, ki ga je treba v čim krajšem času poslati nazaj v mikrobiološki laboratorij.

Ustrezen prenos in shranjevanje kužnin za molekularne preiskave je pri temperaturi 4 °C. Ker pa je količina vzorca pri očesnih

Tabela 2. Priporočila za odvzem vzorcev v oftalmologiji.

Mikroorganizmi	Preiskava	Način odvzema	Shranjevanje in transport	Opombe
Bakterije Glive	kultura	Bris v Amies/ Stuartovem transportnem gojišču za bakterije in/ali glive	≤ 24 h na ST	Če želimo tudi preparat po Gramu, posljemo dodaten bris brez transportnega gojišča ali naredimo razmaz na sterilnem objektnem stekelcu. Če je kultivacija neuspešna, lahko dodatno opravimo molekularni dokaz bakterijskih povzročiteljev.
		Tekoče gojišče (npr. Tarozzi) za bakterije; gojišče Sabouraud za glive (material inokuliramo direktno v gojišče)	≤ 24 h na ST	
		Vzorec prekatne vodke prenašamo nerazredčeno v brizgi. Vzorec nerazredčene ali razredčene steklovine prenašamo v brizgi.	≤ 2 h na ST	
	PCR	Epruveta s sterilno fiziološko raztopino	≤ 2 h na ST, sicer ≤ 24 h pri 4 °C	
<i>Chlamydia trachomatis</i> : <i>Neisseria gonorrhoeae</i> : <i>Mycoplasma hominis</i> in <i>Ureaplasma spp.</i> :	PCR, izolacija PCR* PCR, izolacija	Dakronska/krtačna ščetka – transportno gojišče za klamidije	≤ 2 h na ST, sicer ≤ 24 h pri 4 °C	*Preiskava se izvaja v kombinaciji s <i>C.</i> <i>trachomatis</i>
Virusi (HSV, VZV, CMV, EBV ...)	PCR	Bris v transportnem gojišču za viruse	≤ 2 h na ST, sicer ≤ 24 h pri 4 °C	
		Vzorec prekatne vodke prenašamo v brizgi nerazredčeno.		
		Vzorec nerazredčene ali razredčene steklovine prenašamo v brizgi.		
<i>Toxoplasma gondii</i> : <i>Toxocara canis</i> :	PCR PCR	Vzorec prekatne vodke prenašamo v brizgi nerazredčeno.	≤ 2 h na ST, sicer ≤ 24 h pri 4 °C	
<i>Acanthamoeba</i> <i>spp.</i>	kultura	Gojišče PAGE z <i>E. coli</i>	≤ 15 min na ST, sicer ≤ 4 h pri 37 °C	Če se gojišče nacepi v laboratoriju iz vzorca v fiziološki raztopini, se ne sme shranjevati pri 4 °C, temveč na ST
	PCR	Epruveta s sterilno fiziološko raztopino	≤ 2 h na ST, sicer ≤ 24 h pri 4 °C	

Legenda: ST – sobna temperatura

okužbah izredno majhna, je vzorec navadno poslan v eni transportni embalaži, iz kate-re glede na naročene preiskave v mikrobiološkem laboratoriju del vzorca namenimo za klasično kultivacijo, del pa za molekular-

no diagnostiko. V tem primeru upoštevamo pogoje prenosa in shranjevanja za klasično kultivacijo, torej do 2 uri pri sobni tempera-turi, dlje pa pri 4 °C, da povečamo možnosti preživetja bakterij.

BRIS RAZJEDE SOLZNE VREČKE/ SOLZNEGA KANALČKA, BRIS ROBA VEKE

Za odvzem brisa razjede solzne vrečke/kanalikula ali roba veke se v klinični praksi odločimo, kadar gre za izrazito kronično vnetje ali okužbo, ki se ne odziva na empirično uvedeno lokalno ali sistemsko terapijo.

Bris roba veke odvezamemo tako, da z bombažno konico paličice podrgnemo po robu veke. Pred brisom lahko iztisnemo izločke Meibomovih žlez in obrišemo tudi te. Pozorni moramo biti, da se pri tem ne dotikamo kože v okolici ali veznice. Svetujemo, da se pri odvzemu brisa paličico prime s sterilno rokavico na sterilnem delu držala blizu bombažne konice, saj sicer ne moremo natančno obrisati le roba veke ali solznega kanalčka.

BRIS VEZNICE

Pri akutnem konjunktivitisu se za bris veznice ne odločamo rutinsko. Izjeme so sum na gonokokni konjunktivitis, po operacijah ali odprti poškodbi očesa.

Bris veznice sicer odvezamemo pri kroničnih konjunktivitisih, ki se ne odzivajo na empirično zdravljenje. Povzročitelji so lahko: bakterije (npr. *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, klamidije), glive ali virusi (npr. adenovirusi, herpes virusi) (1). Glede na to, na katerega povzročitelja sumimo, se odločimo za ustrezno transportno gojišče za bakterije/glive, viruse ali klamidije (Tabela 2). Bris odvezamemo iz spodnjega forniksa pri sumu na okužbo z bakterijami, glivami in virusi ter z zgornje veznice evvertirane veke pri sumu na klamidijo (trahom). Ker so klamidije znotrajcelične bakterije, je treba odločno obrisati odvzemno mesto. Z eno roko odmaknemo spodnjo veko, da razkrijemo spodnji forniks, nato z brisom podrgnemo po fornixu in tarzalni veznici, ne da bi se pri tem dotaknili kože vek.

POSTRŽEK ROŽENICE

Za postržek roženice se odločimo, kadar je infiltrat roženice centralno ležeč, velik, globok, atipičen, kroničen in kadar ne dobimo zelenega odgovora na empirično uvedeno antibiotično terapijo (9, 10). Še posebno pozorni moramo biti pri nosilcih kontaktnih leč in pri bolnikih, ki so imeli očesne operacije (10). Možen je zelo širok spekter povzročiteljev: npr. herpes virusi, bakterije, glive, paraziti (*Acanthamoeba* spp.). Povzročitelje iščemo glede na klinično sliko in dejavnike tveganja. Postržek roženice odvezamemo pred empirično uvedenimi protimikrobnimi zdravili; če zdravljenje že poteka, pa po 24–48-urni terapevtski pavzi, če s tem ne tvegamo prehudega poslabšanja.

V oko pacienta damo kapljico anestetika. Asistenta prosimo, da razpre veke in jih drži razprte. S sterilnimi rokavicami primeemo sterilno spatulo in previdno postrgamo razjedo roženice tako, da pridobimo material z dna in roba razjede (Slika 1). Če je prisoten izcedek, ga pred odvzecom vzorca odstranimo. Postržek lahko nato razmažemo na stekelca za direktni razmaz, kar nam omogoča hitro opredelitev bakterijskih povzročiteljev glede na barvanje po Gramu, če so ti prisotni v kužnini. Postržek sicer inokuliramo v transportno gojišče (redkeje neposredno na trdno bakteriološko ali mikološko) za izolacijo in kultivacijo bakterijskih povzročiteljev ali gliv, redkeje za dokazovanje patogenov z molekularnimi metodami.

VZORČENJE PREKATNE VODKE

Vzorčenje prekatne vodke najpogosteje izvajamo v sklopu diagnostike uveitisa ob sumu na infekcijskega povzročitelja. Uporabljamo lahko molekularne ali serološke metode. Najpogostejši povzročitelji, ki jih poskušamo identificirati z molekularnimi in/ali serološkimi metodami, so herpes virusi in toksoplazma. Intraope-

rativno prekatno vodko odvezamo tudi pri diagnostiki endoftalmitisov, kjer iščemo povzročitelja s kulturo, če rasti ni, pa z molekularno metodo. Vzorčenje prekatne vodke je invaziven kirurški poseg, izvajamo ga s standardiziranim postopkom, ki ga je opisal van der Lelij (16). Poseg izvedemo v čisti sobi. Bolniku vstavimo blefarostat, apliciramo topični anestetik, površino steriliziramo s povidon-jodom, ki ga nato izperemo s fiziološko raztopino. Oko s pin-ceto, s katero držimo področje ob limbusu, trdno fiksiramo. S 27 gauge iglo na nasprotni strani očesa vstopimo v sprednji prekat in aspiriramo do 200 µl vzorca (Slika 2). Po odvzemu v oko kapnemo midriatik in tesno obvežemo za 2 uri. Prekatno vodko prenašamo v brizgi nerazredčeno takoj po odvzemu.

VZOREC STEKLOVINE

Za odvzem vzorca steklovine se najpogosteje odločamo v sklopu diagnostike endoftalmitisov (17). Vzorec steklovine je pomemben za ločevanje med infekcijsko, vnetno ali neoplastično etiologijo znotraj-jočasne spremembe. Gre za invaziven operativni poseg, ki ga opravimo v operacijski dvorani. Pred posegom steriliziramo očesno površino. Vzorce steklovine odvezamo s posebnim instrumentom, imenovanim vitrektom, ki istočasno reže in aspirira steklovino (Slika 3). Na preiska-

ve pošljemo nerazredčeno steklovino, ki je lahko pridobimo 0,5–0,6 ml, in razredčeno steklovino, ki je lahko dobimo več, saj je steklovina razredčena z infuzijo posebne intraokularne raztopine (17). Vzorce pošljemo v laboratorij direktno v brizgi ali v tekočem gojišču (Tarozzi). Povzročitelji endoftalmitisa so lahko bakterije, glive in paraziti (17).

ZAKLJUČEK

Okužbe v oftalmologiji so razmeroma pogoste. Njihova klinična slika pa, razen redkih izjem, ni specifična za določen mikroorganizem. Možen je tudi zelo širok spekter povzročiteljev (bakterije, virusi, glive, paraziti). Zato je za natančnejšo etiološko opredelitev okužb potrebna široka izbira/razpoložljivost mikrobioloških metod. Ker je zaradi majhnosti očesnih struktur količina odvzetih vzorcev vedno izredno majhna, je pri preiskavah pogosto treba določiti prioritete. Zato je pomembna komunikacija med oftalmologi in kliničnimi mikrobiologi za izdelavo in implementacijo diagnostičnih algoritmov, ki bi izboljšali možnosti detekcije očesnih patogenov. Ključna je tudi predanalizna faza, kjer je poleg kakovostnega odvzema pomembno zagotoviti čim krajši čas od odvzema kužnine do inokulacije vzorca v ustrezno gojišče ter čim krajši čas prenosa vzorca v mikrobiološki laboratorij.

LITERATURA

1. Babitha V, Jyothi PT. Microbiology for general ophthalmologists. Kerala J Ophthalmol. 2017;29:72–78.
2. Sharma S. Diagnosis of infectious diseases of the eye. Eye. 2012;26(2):177–184.
3. Gray LD. Cumitech 13b: Laboratory Diagnosis of Ocular Infections. Washington, DC: ASM Press; 2011.
4. Splošna navodila za odvzem in transport vzorcev za mikrobiološke preiskave. Ljubljana: Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta; 2021 [citirano 09.12.2021]. Dosegljivo na: http://www.imi.si/dokumenti/N_BMK_SPL_1_ODVZEM_TRANSPORT_Zunanji.pdf.
5. CLSI. Collection, transport, preparation, and storage of specimens for molecular methods. CLSI document MM13. 2nd ed. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
6. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the In-

fectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis.* 2013; 57: e22–e121.

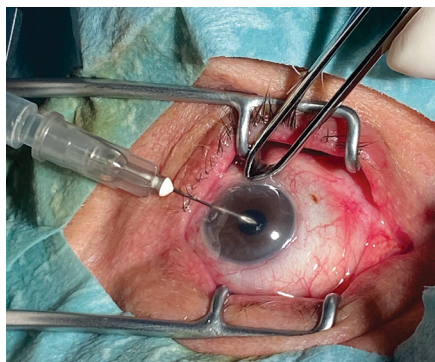
7. Amouzegar A, Chauhan SK, Dana R. Alloimmunity and Tolerance in Corneal Transplantation. *J Immunol.* 2016; 196(10): 3983–3991.
8. Denniston A, Murray P. *Oxford Handbook of Ophthalmology.* Oxford, UK: Oxford University Press; 2018.
9. Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management.* 5th ed. New York: Elsevier; 2022.
10. American Academy of Ophthalmology. Bacterial Keratitis Preferred practice Pattern; 2018. Dosegljivo na: <https://www.aao.org/preferred-practice-pattern/bacterial-keratitis-ppp-2018>.
11. Stirn Kranjc B, Vidović Valentincic N, Globočnik Petrovič M, et al. eds. *Uveitis: izbrana poglavja iz oftalmologije.* Ljubljana: Očesna klinika, Univerzitetni klinični center, Ješetov dan, 2014.
12. Barry P, Cordovés L, Gardner S. *ESCRS Guidelines for Prevention and Treatment of Endophthalmitis Following Cataract Surgery: Data, Dilemmas and Conclusions.* Dublin, Ireland; European Society of Cataract and Refractive Surgeons; 2013.
13. Mills DM, Bodman MG, Meyer DR, et al. Group for the ADS. *The Microbiologic Spectrum of Dacryocystitis: A National Study of Acute*

Versus Chronic Infection. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg.* 2007;23(4): 302–6.

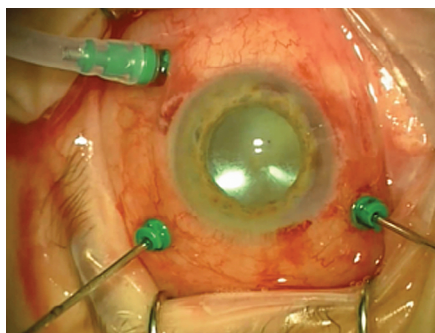
14. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16s rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol.* 2003; 52(Pt 8): 685–91.
15. Lužnik Z, Cerar Kišek T, Ružič-Sabljic E, et al. Evbakterijski PCR – uporabnost molekularne metode v klinični praksi. *Zdrav Vestn.* 2015;84(10): 688–693.
16. Van der Lelij A, Rothova A. Diagnostic anterior chamber paracentesis in uveitis: a safe procedure? *Br J Ophthalmol.* 1997; 81: 976–9.
17. Lumi X, Petrovski G, Vasileva B, et al. Endophthalmitis Prevention, Diagnostic Procedures and Treatment. *Optom Open Access.* 2016;01(02): 1–5.



Slika 1: Postržek roženice
S sterilno spatulo postrgamo material z dna in roba roženične razjede.



Slika 2: Odvzem vzorca prekatne vodke
S 27 gauge iglo iz sprednjega prekata aspiriramo do 200 µl vzorca.



Slika 3: Odvzem vzorca steklovine
Z vitrektomom odvajamo 0,5–0,6 ml nerazredčene steklovine in razredčeno steklovino.

Mateja Pirš,¹ Tatjana Mrvič,² Lea Knez,³ Urška Kramar⁴

Nadzorne kužnine za presejanje na večkratno odporne bakterije

Surveillance screening for multidrug-resistant bacteria

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: večkratno odporne bakterije, presejanje, nadzorne kužnine

Prevalenca večkratno odpornih bakterij (VOB) v Sloveniji je v primerjavi s sosednjimi in ostalimi srednjeevropskimi državami relativno nizka. Tako kot v drugih državah z nizko prevalenco VOB je bilo tudi v Sloveniji vpeljana presejanje na nosilstvo VOB z jemanjem nadzornih kužnin v bolnišnicah in drugih ustanovah, ki se ukvarjajo z zdravstveno dejavnostjo. Enotna navodila za presejanje na nosilstvo VOB je pripravila Nacionalna komisija za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb (NAKOBO). Zdravstvene ustanove opravljajo različne dejavnosti in obravnavajo različne skupine pacientov, zato je treba priporočila prilagoditi individualni ustanovi oziroma jih uskladiti z lokalnimi razmerami. Aktivno iščemo nosilce klinično in epidemiološko najpomembnejših VOB, med katerimi so proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* (MRSA), proti vankomicinu odporni enterokoki (VRE), enterobakterije, ki izločajo betalaktamaze razširjenega spektra (angl. *extended spectrum betalactamase* – ESBL), ter proti karbapenemom odporni po Gramu negativni bacili (GNB CR) in po Gramu negativni bacili, ki izločajo karbapenemaze (GNB CP) (1). Z GNB CR/CP se srečujemo pri enterobakterijah (enterobakterije, odporne proti karbapenemom – CRE; enterobakterije, ki izločajo karbapenemaze – CRE-CPE ali CPE) in pri nefermentativnih GNB (*Pseudomonas aeruginosa*, odporen proti karbapenemom in drugim betalaktamskim antibiotikom – CRPs; *P. aeruginosa*, ki izloča karbapenemaze – CRPs-CP; *Acinetobacter baumannii*, odporen proti karbapenemom – CRAb; *A. baumannii*, ki izloča karbapenemaze – CRAb-CP).

ABSTRACT

KEY WORDS: multidrug-resistant bacteria, screening, surveillance swabs

The prevalence of multidrug-resistant bacteria (MDR) in Slovenia is relatively low compared to neighboring and other Central European countries. As in other countries with a low MDR prevalence, screening for MDR carriers was also introduced in Slovenia by taking surveillance swabs in hospitals and other institutions engaged in health care. The National Commission for the Prevention and Control of Hospital Infections (NAKOBO)

¹ Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška c. 4, 1000 Ljubljana

² Služba za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb, UKC Ljubljana, Zaloška c. 2

³ Enota za obvladovanje bolnišničnih okužb, UKC Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

⁴ Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

prepared uniform instructions for screening for MDR. Healthcare institutions perform different activities and treat different groups of patients, so the recommendations must be adapted to the individual institution or harmonized with local conditions.

We are actively looking for carriers of the clinically and epidemiologically most important MDR, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant enterococci (VRE), enterobacteria that secrete extended spectrum beta-lactamase (ESBL), and carbapenem-resistant Gram-negative bacilli (GNB CR) and Gram-negative carbapenemase-secreting bacilli (GNB CP) (1). GNB CR/CP is found in enterobacteria (enterobacteria resistant to carbapenems - CRE; enterobacteria that secrete carbapenemases - CRE-CPE or CPE) and in non-fermentative GNB (*Pseudomonas aeruginosa*, resistant to carbapenems and other beta-lactam antibiotics - CRPs; *P. aeruginosa* secreting carbapenemases - CRPs-CP; carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* - CRAb; carbapenemase-secreting *A. baumannii* - CRAb-CP) (3, 4).

UVOD

Odpornost bakterij proti antibiotikom se pojavlja že od nekdaj. Vendar je množična proizvodnja in uporaba antibiotikov od štiridesetih let 20. stoletja pripeljala do edinstvenega selekcijskega pritiska. Svetovna zdravstvena organizacija je ugotovila, da odpornost proti antibiotikom predstavlja potencialno grožnjo normalnemu delovanju zdravstvenega sistema, in pozvala zdravstvene ustanove, naj vložijo veliko truda v njeno omejevanje.

Jemanje nadzornih kužnin (presejanje) za ugotavljanje nosilstva večkratno odpornih bakterij (VOB) je eden od ukrepov, namenjenih omejevanju širjenja okužb z VOB v zdravstvenih ustanovah. Ukrep presejanja na prisotnost VOB se izvaja tako pri nas kot v večini drugih držav selektivno samo pri določenih skupinah bolnikov, kar v vsakdanji praksi včasih povzroči težave, saj imajo bolniki oziroma njihovi najbližji občutki, da gre za diskriminacijo v primerjavi z drugimi bolniki, zato se s preiskavami ne strinjajo. Večina javnozdravstvenih etičnih priporočil si je enotna, da so koristi učinkovitosti, pravičnosti in proporcionalnosti ključne pri ocenjevanju navodil ter izvajanju specifičnih in konkretnih ukrepov, tudi na področju obvladovanja nalezljivih bolezni.

V slovenski zakonodaji najdemo več dokumentov, ki zadevajo področje VOB z vidika pravic in dolžnosti pacientov ter izvajalcev zdravstvene dejavnosti. Že v Ustavi republike Slovenije je v 15. členu zapisano, da so človekove pravice in temeljne svoboščine omejene samo s pravicami drugih in v primerih, ki jih določa ustava (4). Pravne podlage za odvzem nadzornih kužnin na prisotnost VOB pa so opredeljene v Zakonu o nalezljivih boleznih (4., 43. in 44. člen) (5), Zakonu o pacientovih pravicah (4. in 11. člen) (6) ter v Strokovnih podlagah za pripravo programa za obvladovanje in preprečevanje bolnišničnih okužb iz leta 2010 (7).

V prispevku so opisani postopki odvzema nadzornih kužnin za različne VOB.

JEMANJE NADZORNIH KUŽNIN V SLOVENIJI

Prevalenca VOB v Sloveniji je v primerjavi s sosednjimi in preostalimi srednjeevropskimi državami razmeroma nizka, vendar se v zadnjih letih povečuje predvsem prevalenca večkratno odpornih po Gramu negativnih bacilov (GNB). Tako kot v drugih državah z nizko prevalenco VOB je bilo tudi v Sloveniji vpeljano presejanje na nosilstvo VOB z jemanjem nadzornih kužnin v bolnišnicah in drugih ustanovah, ki se ukvarjajo z zdravstveno dejavnostjo. Zdra-

vstvene ustanove se pri pripravi navodil za presejanje na nosilstvo VOB držijo priporočil, ki jih je pripravila Nacionalna komisija za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb (NAKOB), a jih ustrezno prilagodijo. Pri tem je pomembno, da upoštevajo lokalne razmere (pojavnost VOB na oddelku, v ustanovi, regiji), nacionalno situacijo na področju pojavnosti VOB in v primeru zdravljenja pacientov iz tujine oziroma pri bolnikih, ki so bili v stiku z zdravstvenim sistemom v tujini, tudi situacijo v drugih državah.

Aktivno iščemo nosilce klinično in epidemiološko najpomembnejših VOB, med katerimi so proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* (MRSA), proti vankomicinu odporni enterokoki (VRE), enterobakterije, ki izločajo betalaktamaze razširjenega spektra (angl. *extended spectrum betalactamase* – ESBL), ter proti karbapenemom odporni po Gramu negativni bacili (GNB CR) in po Gramu negativni bacili, ki izločajo karbapenemaze (GNB CP) (1). Z GNB CR/CP se srečujemo pri enterobakterijah (enterobakterije, odporne proti karbapenemom – CRE; enterobakterije, ki izločajo karbapenemaze – CRE-CPE ali CPE) in pri nefermentativnih GNB (*Pseudomonas aeruginosa*, odporen proti karbapenemom in drugim betalaktamskim antibiotikom – CRPs; *P. aeruginosa*, ki izloča karbapenemaze – CRPs-CP; *Acinetobacter baumannii*, odporen proti karbapenemom – CRAb; *A. baumannii*, ki izloča karbapenemaze – CRAb-CP) (3, 4).

Čeprav je prave razsežnosti težav z VOB težko oceniti, nam ocena tveganja pomaga opredeliti, katere VOB lahko pri bolnikih pričakujemo (pojavnost v populaciji) in katere jih ogrožajo (zdravljenje v enotah za intenzivno terapijo, opeklino, operacije, rehabilitacija, kronične bolezni).

Vse zdravstvene ustanove morajo imeti v skladu z veljavno slovensko zakonodajo izdelana navodila za obvladovanje VOB, ki jih morajo upoštevati in izvajati vsi zaposleni (7).

Pri pripravi navodil za odvzem nadzornih kužnin na VOB se moramo vedno vprašati: a) katere VOB iščemo; b) komu jih bomo odvzeli; c) s katerega anatomskega mesta jih bomo odvzeli; d) kako jih bomo odvzeli; e) kdaj jih bomo odvzeli (Tabela 1).

Presejalno testiranje za iskanje nosilstva se običajno izvede v naslednjih situacijah: a) bolniki, premeščeni z drugega oddelka oziroma iz druge bolnišnice; b) bolniki ob sprejemu v enoto za intenzivno zdravljenje; c) bolniki, ki so bili v stiku z zdravstvenim sistemom v tujini; d) oskrbovanci domov za ostarele oziroma drugih ustanov za podaljšano nego; e) bolniki, ki so bili že v preteklosti kolonizirani ali okuženi z VOB; f) bolniki s kroničnimi ranami; g) bolniki, ki so bili hospitalizirani skupaj z nosilcem VOB (7).

1. *Staphylococcus aureus*, odporen proti meticilinu – MRSA

S. aureus poseljuje kožo in sluznice; do tretjina odraslih nosilcev je lahko prehodno nosilec *S. aureus* v nosu. Odpornost proti meticilinu je posledica prisotnosti mobilnih genetskih elementov gena *mecA* ali *mecC*, ki kodira modificirane penicilin vežočne proteine (angl. *penicillin-binding protein*, PBP) (8). MRSA lahko kolonizira številne dele telesa: nos, žrelo, pazduho, dimlje, presredek, zato eno odvzemno mesto ne zadošča. Ker je občutljivost nadzornih odvzemnih mest različna, izberemo kombinacijo kužnin, ki nam omogoča odkritje > 90 % z MRSA koloniziranih pacientov (9).

Najprimernejše nadzorne kužnine so: bris nosnic, bris kožnih gub, če koža ni poškodovana, bris rane ali bris spremembe na koži, bris žrela (aspirat traheje pri bolnikih na umetnem predihavanju) in bris rektuma (Tabela 1). Najpogosteje sočasno odvzamemo brise nosnic, kožnih gub in žrela (9).

Nadzorne kužnine kultiviramo na kromogenih gojiščih za kultivacijo MRSA v

kombinaciji z obogatitvenim tekočim gojiščem (poveča občutljivost metode), ki ga po 24 urah nacepimo na kromogeno gojišče. Porasle kolonije, sumljive za MRSA, identificiramo z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF in jim določimo občutljivost za antibiotike (8, 10, 11). Brise lahko v mikrobiološkem laboratoriju kultiviramo posamično, lahko pa združimo do največ tri vzorce, odvzete z brisi (pri posameznem bolniku ne združujemo vzorcev iz spodnjih dihal, blata ali urina) (12). Postopek kultivacije traja dva dni do negativnega rezultata in se ustrezno podaljša v primeru osamitve *S. aureus*, saj je treba za dokončno potrditev MRSA določiti tudi občutljivost za antibiotike (8, 12).

Možen je tudi dokaz kolonizacije z uporabo molekularnih metod neposredno iz nadzornih kužnin (8, 12).

2. Proti vankomicinu odporni enterokoki – VRE

Naravno mesto kolonizacije človeškega telesa z enterokoki je črevesje. Epidemiološko najpomembnejša vrsta s pridobljeno odpornostjo proti glikopeptidom je *Enterococcus faecium*, veliko redkeje najdemo *E. faecalis* VRE. Pridobljena odpornost proti glikopeptidom pri enterokokih je navadno posledica pridobljenih genov *vanA* in *vanB*, kar vodi v spremembo tarče z zmanjšano afiniteto za glikopeptide (8).

Najprimernejše nadzorne kužnine za ugotavljanje nosilstva VRE sta bris rektuma in blato (Tabela 1).

Nadzorne kužnine kultiviramo na kromogenih gojiščih za kultivacijo VRE. Porasle kolonije, sumljive za enterokoke, identificiramo z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF in jim določimo občutljivost za antibiotike (8, 10, 11). Postopek kultivacije traja dva dni do negativnega rezultata in se ustrezno podaljša v primeru osamitve *E. faecium* in *E. faecalis*, saj je treba za dokončno potrditev VRE določiti tudi občutljivost za antibiotike.

Molekularne metode, s katerimi dokazujemo gena *vanA* in *vanB* neposredno iz nadzornih kužnin, zaradi možnih lažno pozitivnih rezultatov za odkrivanje nosilstva VRE niso optimalne, saj imajo številne v črevesju normalno prisotne anaerobne bakterijske vrste gene *vanB*, zato se izvajajo samo izjemoma (8, 12).

3. Enterobakterije, ki izločajo encime ESBL

Naravno mesto kolonizacije človeškega telesa z enterobakterijami je črevesje. Najpogosteje najdemo ESBL pri vrstah *Escherichia coli* in *Klebsiella pneumoniae*. Geni za betalaktamaze ESBL so zapisani na mobilnih genetskih elementih in spadajo v različne družine betalaktamaz, navadno CTX-M, TEM in SHV (8).

Najprimernejši nadzorni kužnini za ugotavljanje nosilstva sta bris rektuma in blato (Tabela 1). Dodatno se lahko išče kolonizacijo z enterobakterijami, ki izločajo encime ESBL, iz brisa rane, če je prisotna, urina, če je vstavljen urinski kateter, ter drugih kužnin, če je bila v preteklosti iz njih izolirana ESBL-pozitivna bakterija.

Nadzorne kužnine kultiviramo na kromogenih gojiščih za kultivacijo ESBL. Porasle kolonije, sumljive za enterobakterije, ki izločajo encime ESBL, identificiramo z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF in jim določimo občutljivost za antibiotike (8, 10, 11). Postopek kultivacije traja en dan do negativnega rezultata in se ustrezno podaljša v primeru osamitve enterobakterij, ki izločajo encime ESBL, saj je treba za dokončno potrditev ESBL določiti tudi občutljivost za antibiotike.

Molekularno dokazovanje prisotnosti genov za betalaktamaze ESBL neposredno iz nadzorne kužnine ni smiselno, saj poznamo številne encime, le del pa jih je mogoče dokazati neposredno iz kužnine (družina CTX-M), zato se v praksi ne izvaja (8, 12).

4. Proti karbapenemom odporni po Gramu negativni bacili – GNB CR/CP

Odpornost proti karbapenemom je lahko posledica kombinacije izločanja betalaktamaz razširjenega spektra (ESBL) ali cefalosporinaz (ampC) v kombinaciji z izgubo porinov in prisotnostjo izlivnih črpalk (CR), lahko pa je posledica izločanja karbapenemaz (CP). Geni za karbapenemaze so zapisani na mobilnih genetskih elementih in spadajo v različne družine betalaktamaz, navadno KPC, VIM, NDM in OXA-48. Pri *A. baumannii* običajno najdemo druge karbapenemaze, predvsem iz družine OXA-23 in OXA-40 (8).

4.1. Enterobakterije

Naravno mesto kolonizacije človeškega telesa z enterobakterijami je črevesje. Najpogosteje najdemo CR/CP-enterobakterije pri vrstah *E. coli* in *K. pneumoniae*, manj pogosto pri rodu *Enterobacter* in *Citrobacter*.

Najprimernejši nadzorni kužnini za ugotavljanje nosilstva sta bris rektuma in blato. Dodatno se lahko išče kolonizacijo z CR/CP-enterobakterijami iz brisa rane, če je prisotna, urina, če je vstavljen urinski kateter, pri bolnikih na mehanski ventilaciji tudi iz aspirata traheje ter iz drugih kužnin, če je bila v preteklosti iz njih izolirana CR/CP-enterobakterija (Tabela 1).

Nadzorne kužnine kultiviramo na kromogenih gojiščih za kultivacijo GNB CR/CP v kombinaciji z obogatitvenim tekočim gojiščem (poveča občutljivost metode), ki ga po 24 urah nacepimo na kromogeno gojišče. Porasle kolonije, sumljive za CR/CP-enterobakterije, identificiramo z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF, jim določimo občutljivost za antibiotike ter s fenotipskimi in molekularnimi postopki preverimo prisotnost karbapenemaz (8, 10, 11, 13). Postopek kultivacije traja dva dni do negativnega rezultata in se ustrezno podaljša v primeru osamitve CR/CP-enterobakterij, saj je

treba za dokončno potrditev CR/CP določiti tudi občutljivost za antibiotike.

Molekularno dokazovanje prisotnosti genov za karbapenemaze neposredno iz kužnine se običajno izvaja z uporabo molekularnih panelov, ki vključujejo epidemiološko najpomembnejše karbapenemaze iz družin KPC, VIM, IMP, NDM in OXA-48. Smiselno je le v kombinaciji s kultivacijo, saj so geni zapisani na mobilnih genetskih elementih in se lahko pojavijo pri različnih bakterijskih vrstah, zato se postopek v praksi redko izvaja, navadno po dogovoru z bolnišnično KOBO. Če se odločimo za tovrstno testiranje, sta potrebna dva brisa rektuma – eden za molekularni test, drugi za kultivacijo (8, 12).

4.2. *P. aeruginosa*

P. aeruginosa je oportunistični patogen, ki redko kolonizira sicer zdrave ljudi; do 7 % ljudi ga ima lahko v nosu, žrelu ali na koži, pri največ 24 % pa ga najdemo v rektumu. Kolonizacije so bistveno pogostejše pri hospitaliziranih bolnikih. Pogosto ga najdemo v okoljskih nišah, predvsem v vlažnem okolju (14).

Najprimernejši nadzorni kužnini za ugotavljanje nosilstva sta bris rektuma in blato. Dodatno se lahko išče kolonizacijo s CRPs/CRPs-CP iz brisa rane, če je prisotna, urina, če je vstavljen urinski kateter, pri bolnikih na mehanski ventilaciji tudi iz aspirata traheje ter drugih kužnin, če je bil v preteklosti iz njih izoliran CRPs/CRPs-CP (Tabela 1).

Nadzorne kužnine kultiviramo na kromogenih gojiščih za kultivacijo GNB CR/CP v kombinaciji z obogatitvenim tekočim gojiščem (poveča občutljivost metode), ki ga po 24 urah nacepimo na kromogeno gojišče. Porasle kolonije, sumljive za CRPs/CRPs-CP, identificiramo z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF, jim določimo občutljivost za antibiotike ter s fenotipskimi in molekularnimi postopki preverimo pri-

sotnost karbapenemaz (8, 10, 11, 13). Postopek kultivacije traja dva dni do negativnega rezultata in se ustrezno podaljša v primeru osamitve CRPs/CRPs-CP, saj je za dokončno potrditev CR/CP treba določiti tudi občutljivost za antibiotike.

Molekularno dokazovanje prisotnosti genov za karbapenemaze neposredno iz kužnine se običajno izvaja z uporabo molekularnih panelov, ki vključujejo epidemiološko najpomembnejše karbapenemaze iz družin KPC, VIM, IMP, NDM in OXA-48. Smiselno je le v kombinaciji s kultivacijo, saj so geni zapisani na mobilnih genetskih elementih in se lahko pojavijo pri različnih bakterijskih vrstah, zato se v praksi redko izvaja, navadno po dogovoru z bolnišnično

KOBO. Če se odločimo za tovrstno testiranje, sta potrebna dva brisa rektuma – eden za molekularni test, drugi za kultivacijo (8, 12).

4.3. *A. baumannii*

Acinetobaktri pogosto kolonizirajo sicer zdrave ljudi. Pojavnost kolonizacij z *A. baumannii* ni dokončno razjasnjena, pogostejša pa je pri hospitaliziranih bolnikih. Kolonizira predvsem kožo (kožne gube) in zgornja dihala (žrelo) (15, 16). Podobno kot *P. aeruginosa* jih najdemo tudi v okoljskih nišah, predvsem v vlažnem okolju (17).

Najprimernejši nadzorni kužnini za ugotavljanje nosilstva sta bris rektuma in blato. Ker *A. baumannii* lahko kolonizira kožo in žrelo, je priporočljivo iskanje ko-

Tabela 1. Navodila za odvzem in prenos vzorcev (12).

Kužnina/ Vzorec	Način	Embalaža/ Količina vzorca	Lokalni prenos	Daljši prenos
Bris nosu, brisa nosnic	V nosnico vstavimo s sterilno fiziološko raztopino navlažen bris do 2 cm globoko in ga 3–5 x zavrtimo.	Bris v Amies/ Stuartovem transportnem gojišču	≤ 2 h ST	≤ 24 h ST
Bris kože, brisa kožnih gub, brisa perineja, brisa rane	Z brisom dobro odbrišemo odvzemno mesto (pri odvzemu iz kožnih gub najprej odbrišemo obe pazduhi in nato dimlje).	Bris v Amies/ Stuartovem transportnem gojišču	≤ 2 h ST	≤ 24 h ST
Brisa rektuma	Bris previdno vstavimo 3 cm globoko v danko in z nežnim vrtenjem odbrišemo analne kripte; blato mora biti na brisu vidno.	Bris v Amies/ Stuartovem transportnem gojišču	≤ 2 h ST	≤ 24 h ST
Brisa žrela	Jezik potisnemo z lopatko navzdol; z brisom odbrišemo zadnji farinks, tonzile in nebne loke.	Bris v Amies/ Stuartovem transportnem gojišču	≤ 2 h ST	≤ 24 h ST
Aspirat traheje, BAL	Pri intubiranem bolniku aspiriramo vsebino iz spodnjih dihal.	Sterilna posodica z navojem / ≥ 1 ml	≤ 2 h ST	≤ 24 h ST
Sputum	Odvzem ob nadzoru sestre: bolnik si s krtačko umije zobe, usta spere z vodo, če ima protezo, jo odstrani; globoko se izkašlja v sterilno posodico.	Sterilna posodica z navojem / ≥ 1 ml	≤ 2 h ST	≤ 24 h ST
Urin	S prostim mokrenjem (srednji curek) ali iz katetra.	Sterilna posodica z navojem / ≥ 10 ml	≤ 2 h ST	≤ 24 h ST
Blato	Po defekaciji blato z žličko spravimo v čisto posodico.	Posodica z žličko / 2–3 ml	≤ 2 h ST	≤ 24 h ST

lonizacije s CRAb/CRAb-CP tudi iz brisa kože, predvsem pazduhe in dimelj ter žrela (18, 19). Dodatno se išče kolonizacijo iz brisa rane, če je prisotna, urina, če je vstavljen urinski kateter, pri bolnikih na mehanski ventilaciji tudi iz aspirata traheje ter drugih kužnin, če je bil v preteklosti iz njih izoliran CRAb/CRAb-CP (Tabela 1).

Nadzorne kužnine kultiviramo na kromogenih gojiščih za kultivacijo GNB CR/CP v kombinaciji z obogatitvenim tekočim gojiščem (poveča občutljivost metode), ki ga po 24 urah nacepimo na kromogeno gojišče. Porasle kolonije, sumljive za CRAb/CRAb-CP, identificiramo z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF, jim določimo občutljivost za antibiotike ter s fenotipskimi in molekularnimi postopki preverimo prisotnost karbapenemaz (8, 10, 11, 13). Postopek kultivacije traja dva dni do negativnega

rezultata in se ustrezno podaljša v primeru osamitve CRAb/CRAb-CP, saj je treba za dokončno potrditev CR/CP določiti tudi občutljivost za antibiotike.

Pri CRAb-CP navadno najdemo drugačne karbapenemaze kot pri CPE ali CRPs-CP, predvsem karbapenemaze iz družin OXA-23 in OXA-40, ki večinoma niso vključene v molekularne panele za določanje karbapenemaz, zato se ta postopek ne izvaja (8,12).

ZAKLJUČEK

V Sloveniji imamo vpeljana presejanje na nosilstvo VOB z jemanjem nadzornih kužnin v bolnišnicah in drugih ustanovah, ki se ukvarjajo z zdravstveno dejavnostjo. Navodila za presejanje na nosilstvo VOB, ki jih je pripravila NAKOBO, je treba prilagoditi individualni ustanovi oziroma jih uskladiti z lokalnimi razmerami.

LITERATURA

1. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2014 [cited 2023 Jan 13]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>.
2. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*. 2019 Nov 13;69(Supplement_7): S521–8.
3. Pirš M, Štrumbelj I, Lejko Zupanc T. Doku-ment SKUOPZ 003. Enterobakterije, *Acinetobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa* – označevanje večkratno odpornih izolatov in okrajšave preiskav nadzornih kužnin – 2. izdaja, april 2022 Available from: <https://imi.si/skuopz/>.
4. Ustava Republike Slovenije. 1991. Available from: <http://pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=USTA1>.
5. Zakon o nalezljivih boleznih. (ZNB) Uradni list RS (neuradno prečiščeno besedilo); 2022. Available from: <http://pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=ZAKO433>.
6. Zakon o pacientovih pravicah (ZPacP). Uradni list RS; 2008. Available from: <http://pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=ZAKO4281>.
7. Delovna skupina pri Ministrstvu za zdravje RS. Strokovne podlage in smernice za obvladovanje in preprečevanje okužb, ki so povezane z zdravstvom oziroma zdravstveno oskrbo [Internet]; 2009; Available from: <https://www.gov.si/assets/ministrstva/MZ/DOKUMENTI/Smernice-NAKOBO-za-strokovnjake.pdf>.
8. Carrol K, Pfaller M, Landry M, McAdam A, Patel R, Richter S, et al., editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 12th ed. ASM Press; 2019.
9. Lautenbach E, Nachamkin I, Hu B, Fishman NO, Tolomeo P, Prasad P, et al. Surveillance Cultures for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Diagnostic Yield of Anatomic Sites and Comparison of Provider- and Patient-Collected Samples. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009 Apr;30(4): 380–2.
10. Ihan A, Mueller Premru M, Seme K, Matos T, editors. *Medicinska bakteriologija z mikologijo in parazitologijo*. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo; 2020.
11. Giske C, Martnez-Martnez L, Canton R, Stefani S, Skov R, glupczynski Y, et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance.

- EUCAST; 2017 Jul.
12. Leber AL. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th ed. ASM Press; 2016.
 13. Štrumbelj I, Pirš M, Zupanc TL. Enterobakterije, *Acinetobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa* – označevanje večkratno odpornih izolatov in okrajšave preiskav nadzornih kužnin. SKUOPZ; 2015 p. 4. Available from: <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/dokumenti/lzd001OznakeokrajaveinpreiskavenaodporneGNB.pdf>.
 14. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009 Oct;22(4): 582–610.
 15. Sebeny PJ, Riddle MS, Petersen K. *Acinetobacter baumannii* Skin and Soft-Tissue Infection Associated with War Trauma. *CLIN INFECT DIS*. 2008 Aug 15;47(4): 444–9.
 16. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2006 Mar;42(5): 692–9.
 17. Nutman A, Lerner A, Schwartz D, Carmeli Y. Evaluation of carriage and environmental contamination by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016 Nov;22(11): 949.e5-949.e7.
 18. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwartz D, Tarabeia J, Fefer I, Schwaber MJ, et al. Surveillance Cultures and Duration of Carriage of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007 May;45(5): 1551–5.
 19. Rivera F, Reeme A, Graham MB, Buchan BW, Ledebøer NA, Valley AM, et al. Surveillance cultures following a regional outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2022 Apr;43(4): 454–60.

Milena Kerin Povšič¹

Žilni katetri, črpalke, vsadki in drugi umetni materiali: odvzem vzorcev za mikrobiološko preiskavo

Vascular catheters, cardiac implantable electronic devices and other synthetic materials: sample collection for microbiological examination

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: žilni kateter, vsadna srčna elektronska naprava, biofilm, sepsa, hemokultura

Žilni katetri in vsadne srčne elektronske naprave so dejavnik tveganja za nastanek sepse, septičnega šoka in metastatskih okužb. Posebno ogroženi so onkološki bolniki, ki imajo oslabilen imunski sistem in pogosto vstavljen kratkotrajen ali dolgotrajen osrednji venski kateter. Okužba povzroči odlog specifičnega zdravljenja, kar poslabša prognozo bolezni. Patogenetski mehanizem je nastanek biofilma na tuji površini in sproščanje mikroorganizmov v krvni obtok. Pomembni so pravočasen in pravilen odvzem vzorcev za mikrobiološke preiskave, hitra diagnoza in začetek zdravljenja. Pri sumu na okužbo tujka v srčno-žilnem sistemu se pred začetkom protimikrobnega zdravljenja odvzame kri za hemokulturo. Pri žilnem katetru se odvzame kri za parno hemokulturo dvakrat zapored, pri subakutni okužbi vsadne srčne elektronske naprave pa kri za hemokulturo iz periferne vene trikrat zapored. Odvzem krvi se ponovi 48 ur po odstranitvi vsadne srčne elektronske naprave, pri žilnem katetru pa v primeru, če je iz krvi izoliran *Staphylococcus aureus* ali *Candida* spp. Preostale kužnine so konica žilnega katetra ali elektrode, pri implantiranem katetru pa izpirek notranjosti katetra. Katetrsko sepso potrdi izolacija istega mikroorganizma iz konice katetra in najmanj ene hemokulture iz periferne vene. Analiza rezultatov mikrobioloških preiskav konic osrednjih venskih katetrov na Onkološkem inštitutu je pokazala, da je bilo v letu 2019 pozitivnih 13,5 % vseh konic, poslanih na mikrobiološko preiskavo, v letu 2020 pa 18,1 %. Dve tretjini teh bolnikov sta imeli potrjeno ali verjetno katetrsko sepso. Pri 94 % je bil vzrok zanjo dolgotrajen osrednji venski kateter. Večina bolnikov v tej skupini je imela parenteralno prehrano na domu.

ABSTRACT

KEY WORDS: vascular catheter, cardiac implantable electronic device, biofilm, sepsis, blood culture

Vascular catheters and cardiac implantable electronic devices are risk factors for sepsis, septic shock and metastatic infections. They pose a serious threat to immunocompromised cancer patients, who often require the insertion of short-term or long-term

¹ Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana. Korespondenca/correspondence: mkerin@onko-i.si.

central venous catheters as part of their cancer treatment. Such infections postpone previously planned treatment protocols and frequently worsen the prognosis of the original disease. The mechanism of pathogenesis starts with biofilm formation on synthetic materials, leading to bacteremia and bloodstream infections. Such cases require prompt and appropriate methods of sampling for further microbiological examinations, a fast diagnosis and treatment initiation.

The assessment of patients with a suspected foreign body infection of the vascular system should include blood culture collection prior to antimicrobial treatment. In cases of intravascular catheters, blood cultures should be collected twice in a row for a paired blood culture, while subacute infections of cardiac implantable electronic devices require three consecutive blood culture collections from a peripheral vein. Blood culture collection should be repeated 48 hours after the removal of an infected cardiac implantable electronic device or, if vascular catheters are involved, in cases where *Staphylococcus aureus* or *Candida* spp. are isolated and identified. Other cultures include the tip of the vascular catheter, the tip of the vascular electrode and the contents of implanted intravascular catheters. A catheter-related sepsis is confirmed when the same microorganism is isolated from the catheter tip and from at least one blood culture, taken from the patient's peripheral vein.

An analysis at the Institute of Oncology Ljubljana in 2019 and 2020 revealed that 13.5% and 18.1% respectively, of all catheter tips sent to the laboratory for microbiological examination were positive. Two thirds of these patients had a confirmed or probable catheter-related sepsis. Its cause was a long-term central venous catheter in 94% of the cases. Most of these patients had been receiving parenteral nutrition at home.

UVOD

Žilni katetri so venski in arterijski. Indikacije zanje so različne. Osrednji venski katetri (OVK) imajo konico v distalnem delu zgornje votle vene (*vena cava superior*), tik pred vstopom v desni atrij. Namenjeni so aplikaciji vazoaktivnih zdravil, parenteralne prehrane, antibiotikov, citostatikov, krvnih derivatov, merjenju hemodinamskih parametrov in odvzemu krvnih vzorcev. Kratkotrajni OVK so netunelirani in ostanejo in situ do 14 dni. Imajo enega do pet lumnov. Uporabljajo se predvsem pri kirurških bolnikih in v enotah intenzivne terapije. Dolgotrajni OVK so tunelirani (Hickman, Broviac) ali popolnoma implantirani (angl. *venous access port*, VAP). Tuneliran OVK poteka od prehoda skozi kožo do vstopa v žilo skozi nekaj centimetrov dolg podkožni kanal. VAP se vstavi z manjšim kirurškim posegom. Podkožni

rezervoar ima stik s kožo prek Huberjeve igle samo takrat, ko je kateter v uporabi. Med dolgotrajne OVK v širšem smislu prištevamo tudi periferno uvedene OVK (angl. *peripherally inserted central catheter*, PICC), ki so daljši, uvedeni v eno od ven na nadlahti in so lahko tunelirani. Imajo enega do tri lumne. Dolgotrajni OVK ostanejo in situ več mesecev ali let. Namenjeni so občasni aplikaciji zdravil, zlasti za kemoterapijo in parenteralno prehrano na domu.

Arterijski katetri so namenjeni za invazivno merjenje krvnega tlaka in odvzem vzorcev krvi za plinsko analizo. Najpogosteje se uporabi kratek kateter, dolžine 4,5 cm. Posebna oblika arterijskega katetra je termodilucijski kateter (angl. *pulse inducted contour cardiac output*, PiCCO), namenjen za merjenje minutnega volumna srca in drugih hemodinamskih parametrov. Je daljši

(od 8 cm za *a. axillaris* do 50 cm za *a. radialis*) in ima na konici temperaturni senzor.

Najpogostejši zaplet žilnih katetrov so okužbe, pogostejše pri OVK kot pri arterijskih katetrah. Okužba OVK je lokalna ali sistemska, slednja poteka kot katetska sepsa. Incidenca je večja pri kratkotrajnih OVK in bolj ogroženih skupinah bolnikov. To so bolniki z rakom, zlasti v obdobju nevtropenije, po transplantaciji kostnega mozga, bolniki z opeklinami ali okužbo s HIV. Incidenca katetske sepse pri bolnikih z rakom je 0,5–10 na 1000 katetskih dni (1). Neodvisni dejavniki tveganja so akutna mieloična levkemija, levkopenija $\leq 1000/\mu\text{l}$, več kot en OVK pri istem bolniku, zdravljenje s karbapenemi in pljučne bolezni (2). Umrljivost je 12–40 %, odvisno od vrste OVK, spremljajočih bolezni in povzročitelja. Z ustreznimi preventivnimi ukrepi se lahko prepreči do 70 % okužb (3).

PATOGENEZA OKUŽB TUJKOV V SRČNO-ŽILNEM SISTEMU

Mehanizem nastanka okužb žilnih katetrov in vsadnih naprav v srčno-žilnem sistemu je kolonizacija površine z mikroorganizmi in nastanek biofilma. Mikroorganizmi v biofilmu so v speči obliki, ki je odporna proti antibiotikom in delovanju imunskega sistema. Pri kritični debelini se začnejo sproščati v krvni obtok in povzročijo sistemska okužba. Bolj nagnjeni k tvorbi biofilma so *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp., med glivami pa *Candida albicans*, *Candida krusei* in *Candida tropicalis* (4). Magnezijevi, kalcijevi in železovi ioni stabilizirajo biofilm in spodbujajo rast bakterij (5).

Ekstraluminalna kontaminacija z mikroorganizmi je glavna pot pri nastanku okužb kratkotrajnih OVK, intraluminalna pa pri dolgotrajnih OVK (6). Tuje površine se lahko kontaminirajo tudi hematogeno. Hematogena kontaminacija OVK je možna med nevtropenijo, ko pride do translokacije bak-

terij/gliv iz prebavnega trakta skozi črevesno bariero.

DEFINICIJE OKUŽB OVK

Kolonizacija OVK pomeni ≥ 15 CFU mikroorganizmov v kulturi konice katetra (5-centimetrski segment) pri uporabi semikvantitativne metode po Makiju ali ≥ 1000 CFU/ml pri uporabi kvantitativne metode (sonikacija).

Lokalne okužbe glede na vrsto katetra delimo na okužbo vstopnega mesta, okužbo tunela in okužbo podkožnega žepa.

Katetska sepsa je **potrjena**, če je OVK in situ ≥ 48 ur in je izpolnjen eden od treh kriterijev:

- Izolacija istega mikroorganizma iz konice OVK (≥ 15 CFU ali ≥ 1000 CFU/ml) in najmanj ene hemokulture iz periferne vene.
- Izolacija istega mikroorganizma iz kvantitativne hemokulture OVK in iz periferne vene; število kolonij v hemokulturi iz OVK je ≥ 3 -krat večje kot iz periferne vene ali drugega lumna OVK (1).
- Izolacija istega mikroorganizma iz hemokulture OVK in periferne vene; čas do pozitivnosti (angl. *differential time to positivity*, DDTP) hemokulture iz OVK je ≥ 2 uri krajši od časa do pozitivnosti hemokulture iz periferne vene.

Kvantitativna hemokultura in DDTP sta v pomoč pri diagnozi katetske sepse brez odstranitve OVK. DDTP ni zanesljiv kazalec za izključitev katetske sepse pri *Staphylococcus aureus*, ki ima veliko sposobnost sproščanja v cirkulacijo in nastanka metastatskih okužb (7). Podobno velja za *Candida* spp. DDTP kot napovedni kazalec za kandidemijo zaradi OVK ima pri mejni vrednosti ≥ 2 uri visoko občutljivost (94,7 %), a nizko specifičnost (40 %) (8). Zaradi počasnejše rasti gliv v hemokulturi je čas do pozitivnosti daljši (9). Pri obeh povzročiteljih se ob sumu na katetsko sepsa priporoča čim prejšnja odstranitev OVK.

Katetska sepsa je **verjetna**, če je iz he-

mokulture OVK in periferne vene izoliran isti mikroorganizem, drugi kriteriji za potrjeno katetsko sepsa pa niso izpolnjeni, prav tako so izključeni drugi možni izvori okužbe. Katetska sepsa je **možna**, če je iz konice OVK izoliranih ≥ 15 CFU s semikvantitativno metodo ali ≥ 1000 CFU/ml s kvantitativno metodo, če so prisotni klinični ali laboratorijski znaki okužbe (npr. levkocitoza ali povišan C-reaktivni protein), ni potrjene bakteriemije in so izključeni drugi možni izvori okužbe (1).

POVZROČITELJI OKUŽB OVK

Najpogostejši povzročitelji katetske sepse so koagulazno negativni stafilokoki, *Staphylococcus aureus*, enterokoki in streptokoki (10). Po Gramu negativne bakterije *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Klebsiella* spp. povzročijo 20–27 % katetskih seps, *Candida* spp. 2–13 %, polimikrobnih okužb je 11–30 % (11, 12).

KLINIČNI ZNAKI OKUŽB OVK

Znaki lokalne okužbe OVK so rdečina, oteklina, gnojni izcedek, bolečina, pri VAP včasih tudi nekroza kože nad rezervoarjem. Sistemski znaki okužbe so povišana telesna temperatura > 38 °C, mrzlica, znaki sepse (hipotenzija, hipoksemija, zmedenost, oligurija). Septični šok pogosteje povzročijo po Gramu negativne bakterije in glive, redko koagulazno negativni stafilokoki. Možni zapleti katetske sepse so endokarditis, gnojni tromboflebitis, artritis, osteomielitis in abscesi.

ODVZEM KUŽNIN

1. Hemokultura

Hemokultura je mikrobiološka preiskava krvi in zlati standard za diagnozo sepse. Bakteriemija je občasna, bakterije so v krvi prisotne v majhnem številu, ≤ 1 CFU/ml. Pojavi se 1–2 uri pred povišano telesno temperaturo, ob najvišji temperaturi po-

gosto že izzveni. Zato bakteriemijo marsikdaj težko dokažemo.

Ob mrzlici, povišani telesni temperaturi in sumu na katetsko sepsa odvezamemo kri za parno hemokulturo, hkrati iz OVK in periferne vene. Iz OVK odvezamemo kri iz distalnega kraka, ki odraža stanje konice katetra. Odvezemno mesto na koži, krak OVK in pokrovčke hemokulturnih stekleničk očistimo z 2-odstotnim klorheksidinom v 70-odstotnem alkoholu. Z vsakega mesta odvezamemo kri v dve steklenički, najprej v aerobno, nato v anaerobno. Volumen krvi za eno stekleničko je 10 ml (napolnimo jo do oznake). Odvezem krvi ponovimo čez 10–30 minut, časovni interval je odvisen od bolnikovega stanja. Več zaporednih hemokultur poveča občutljivost preiskave. Vsakokrat odvezamemo kri iz druge periferne vene. Kadar odvezem krvi iz periferne vene ni mogoč, odvezamemo kri iz dveh različnih krakov OVK in to ponovimo čez 10–30 minut. Pri sumu na glivno sepsa odvezamemo kri še v gojišče za glive (tretja steklenička). Pomembna je pravilna izvedba postopka, da se prepreči kontaminacija hemokulture z mikroorganizmi. Hemokulturo vedno odvezamemo pred začetkom ali menjavo antibiotične terapije (13, 14). Če hkrati jemljemo kri za laboratorijske preiskave, odvezamemo najprej kri za hemokulturo.

Pri bolnikih z bakteriemijo *Staphylococcus aureus* ali kandidemijo se odvezem krvi za hemokulturo ponavlja na 48 ur, dokler ni hemokultura negativna.

2. Kužnine pri odstranitvi OVK

Pred odstranitvijo OVK vstopno mesto očistimo z 2-odstotnim klorheksidinom v 70-odstotnem alkoholu, da preprečimo kontaminacijo konice. Po izvleku katetra odrežemo konico (5 cm) in jo damo v sterilan lonček. Pri odstranitvi VAP odvezamemo tudi vsebino notranjosti rezervoarja (za to je potrebna odstranitev silikonske membrane) ali izpirek notranjosti katetra.

3. Brisi

Nekateri avtorji priporočajo odvzem brisa kože na vstopnem mestu žilnega katetra ali nad rezervoarjem VAP, če je prisoten izcedek. Občutljivost in specifičnost brisov za napoved kateterske sepse sta nizki (občutljivost 23–45 %, specifičnost 60–63 %) (15). Rutinski odvzem brisov se v klinični praksi ne priporoča.

VSADNE SRČNE ELEKTRONSKE NAPRAVE

Vsadne srčne elektronske naprave (angl. *cardiac implanted electronic devices*, CIED) so namenjene preprečevanju nevarnih aritmij ali so del zdravljenja srčnega popuščanja. Delno ali v celoti so nameščene v velikih žilah in srcu, kar je dejavnik tveganja za nastanek zapletenih okužb. Med CIED prištevamo: srčni spodbujevalnik (angl. *pacemaker*, PM) za preprečevanje bradikardije, vsadni kardioverter-defibrilator (angl. *implantable cardioverter-defibrillator*, ICD) za preprečevanje ventrikularne tahikardije/fibrilacije in napravo za resinhronizacijo (angl. *cardiac resynchronization therapy device*, CRTD) za zdravljenje srčnega popuščanja zaradi neuskkljenega krčenja srčnih prekatov. Vse naprave so sestavljene iz baterije, ki leži v podkožnem žepu, in elektrod v velikih venah, ki baterijo povezujejo s srčno mišico (16).

Razvoj novih generacij CIED gre v smeri zmanjševanja tveganja za nastanek zapletov in nevarnih okužb. Brežžični srčni spodbujevalnik (angl. *leadless pacemaker*, LPM) ima obliko majhne kapsule, pritrjene na septum desnega prekata (17). Podkožni defibrilator (angl. *subcutaneous implantable cardioverter-defibrillator*, SICD) leži v celoti zunaj srčno-žilnega sistema. Baterija in elektroda sta v podkožju, baterija na levi strani prsnega koša, elektroda nad prsnico (18, 19).

OKUŽBE CIED

Okužbe CIED zajamejo podkožni žep in/ali elektrode, lahko tudi endokard na na-

ravnih ali umetnih srčnih zaklopkah. Povzročijo 10 % vseh endokarditisov (20). Incidenca okužb je pri prvi vstavitvi 0,5–0,8 %, pri ponovni pa 2- do 5-krat večja (1–4 %) (21). Dejavniki tveganja so moški spol, srčno popuščanje, kronična obstruktivna pljučna bolezen, ledvična insuficienca, maligna bolezen, podhranjenost, sladkorna bolezen, zdravljenje s kortikosteroidi, vstavev pri torakotomiji, neustrezna kirurška antibiotična profilaksa, predhodna okužba CIED, predhodna uporaba začasnega PM, prisotnost OVK in pooperativni hematomi (16, 22, 23). Raziskave potrjujejo, da je pri bolj kompleksnih napravah več okužb (ICD 8,9 okužbe na 1000 let uporabe, PM 1–2 okužbi na 1000 let uporabe) (24). Vzrok je verjetno bolj zapleten postopek vstavitve in višja starost bolnikov. Umrljivost pri okužbi podkožnega žepa je 5-odstotna, pri sepsi ali endokarditisu pa 29-odstotna (22, 25).

VRSTE OKUŽB CIED

Okužbe CIED delimo na okužbo podkožnega žepa, infekcijski endokarditis elektrod(e) in s CIED povezan infekcijski endokarditis na naravni ali umetni srčni zaklopki. Zgodnja okužba podkožnega žepa nastane v 30 dneh po vstavitvi in se kaže z lokalnimi znaki okužbe, pozna okužba pa več kot 30 dni po vstavitvi naprave. Pozna okužba je nezapletena, če poteka samo z lokalnimi znaki, ali zapletena, če so pridruženi tudi sistemski znaki. Okužbe se lahko pojavijo posamično, pogosteje pa v kombinacijah.

POVZROČITELJI OKUŽB CIED

Najpogostejši povzročitelji okužb CIED so po Gramu pozitivne bakterije (*Staphylococcus epidermidis* in drugi koagulazno negativni stafilokoki, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp.), ki povzročijo 68–93 % okužb. Po Gramu negativne bakterije povzročijo manj kot 18 % okužb, glive

0,5–2 %, polimikrobnih okužb je 2–24,5 %. Kontaminacija CIED je možna že pri izdelavi, med postopkom vstavitve, ob okužbi kirurške rane, razjedi kože nad baterijo ali hematogeno. Asimptomatska kolonizacija CIED s kožnimi bakterijami lahko sčasoma preide v simptomatsko okužbo.

KLINIČNI ZNAKI OKUŽB CIED

Okužba CIED običajno poteka z nespecifičnimi znaki (občasno povišana telesna temperatura, mrzlica, nočno potenje), v manj kot 10 % kot septični šok. Ehokardiografska preiskava srca pokaže vegetacije na elektrodah in/ali srčnih zaklopkah. Nastane lahko insuficienca zaklopk, najpogosteje trikuspidalne zaklopke. Možne so sekundarne okužbe pljuč, hrbtenice (vertebralni osteomielitis, discitis), septični artritis, absces v možganih, pljučih, jetrih, vranici, ledvici (26). Bolniki s CIED in stafilokokno bakteriemijo imajo v 30–45 % okužbo CIED, zato jo moramo aktivno iskati (27).

ODVZEM KUŽNIN ZA MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE

Ob sumu na okužbo CIED odvezamemo hemokulture pred začetkom protimikrobnega zdravljenja. Pri akutnem poteku odvezamemo dve hemokulturi iz periferne vene v 1 uri, pri kroničnem ali subakutnem poteku pa tri hemokulture v 6 urah. Hemokulture odvezamemo še 48 do 72 ur po odstranitvi CIED. Če so pozitivne, se implantacija novega CIED ne priporoča.

Odstranitev celotnega CIED je potrebnega pri vseh okužbah, razen pri zgodnji, nezapleteni okužbi žepa. Indicirana je v prvih 72 urah. Če je mogoče, elektrode odstranimo transvensko. Če to ni mogoče ali če so vegetacije na elektrodi večje od 20 mm, je potrebna klasična operacija na odprtem srcu. Pri odstranitvi CIED odvezamemo kužnine: konica elektrode (distalni in proksimalni del), vegetacija na elektrodi, tkivo iz ležišča baterije (2 cm²), punktat tekočinske kolekcije,

včasih tudi celotna vsadna naprava. Napravo spravimo v primerno veliko sterilno posodo, prelijemo s sterilno Ringerjevo raztopino in pošljemo na sonikacijo. Pri odvzemu kužnin grozi velika možnost kontaminacije, zato mora biti postopek izveden natančno. Koa-gulazno negativni stafilokoki so npr. pogosto kontaminanti in tudi povzročitelji okužbe.

Hemokulture so pozitivne pri 20–67 % bolnikov z okužbo CIED. Rezultat hemokultur je samo v 35 % skladen z rezultatom konice elektrode. Vzrok je verjetno to, da se hemokulture odvezamejo pred začetkom protimikrobnega zdravljenja, konica elektrode pa pozneje, med zdravljenjem. Pri 15 % okužb CIED so vse kulture negativne, povzročitelj ostane neopredeljen (16,28).

Nekateri bolniki z okužbo CIED so prešibki za operativno odstranitev elektrod (3–15 %). Pri njih se odstrani samo baterija in vstavi nova na drugo stran prsnega koša. Sledi vsaj šest tednov zdravljenja s protimikrobnimi zdravili. Nekateri potrebujejo vseživljenjsko protimikrobno zaščito (24).

INTRAAORTNA BALONSKA ČRPALKA

Intraaortna balonska črpalka (angl. *intraaortic balloon pump*, IABP) je znotrajžilni mehanski pripomoček za podporo krvnega obtoka pri bolnikih v kardiogenem šoku. Naprava je dolg kateter, ki se skozi dimeljsko arterijo vstavi v descendentno aorto. Na koncu ima podolgovat balon, ki se med srčnim ciklusom širi in krči, zmanjša sistolično breme in potrebo srčne mišice po kisiku.

Okužbe IABP so redke, 0,1 % (29). Bakterijska kontaminacija lahko nastane pri vstavitvi, skozi vstopno mesto na koži ali hematogeno. Okužbo potrdi izolacija istega mikroorganizma iz hemokulture in konice odstranjenega katetra ali brisa vstopnega mesta katetra. Tveganje za okužbo se večja s časom vstavitve IABP in se pomembno poveča po sedmih dneh (30,31).

PRIPOROČILA ZA ODVZEM VZORCEV ZA MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE

Tabela 1: Odvzem vzorcev za mikrobiološke preiskave pri OVK, CIED in IABP.

Vrsta tujka	Kužnine za mikrobiološke preiskave
Kratkotrajni OVK, PICC, tunelirani OVK	<ul style="list-style-type: none"> parna hemokultura (OVK in periferna vena) distalni del katetra – konica (5 cm) bris vstopnega mesta katetra (če se pojavlja izcedek, brez predhodnega čiščenja z antiseptikom)
VAP	<ul style="list-style-type: none"> parna hemokultura (VAP in periferna vena) distalni del katetra – konica (5 cm) vsebina rezervoarja ali izpirka notranjosti katetra košček tkiva ali bris ležišča rezervoarja
CIED	<ul style="list-style-type: none"> hemokultura (še 48–72 ur po odstranitvi naprave) konica elektrode (distalni in proksimalni del) vegetacija na elektrodi košček tkiva iz ležišča baterije (2 cm²) punktat tekočinske kolekcije cela vsadna naprava (prelijemo s sterilno Ringerjevo raztopino)
IABP	<ul style="list-style-type: none"> hemokultura distalni del katetra – konica bris vstopnega mesta katetra (če se pojavlja izcedek, brez predhodnega čiščenja z antiseptikom)

Legenda: OVK – osrednji venski kateter, PICC – periferno uveden osrednji venski kateter, VAP – popolnoma implantiran osrednji venski kateter, CIED – vsadna srčna elektronska naprava, IABP – intraaortna balonska črpalka

REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE KONIC OVK NA OI LJ V LETIH 2019 IN 2020

Na Onkološkem inštitutu deluje Enota za osrednje venske katetre, sestavljena iz zdravnikov in medicinskih sester, ki skrbi za uvajanje in oskrbo PICC, tuneliranih OVK in VAP. Najpogostejše indikacije za dolgotrajne OVK so kemoterapija ter parenteralna prehrana v bolnišnici in na domu. V letu 2019 je bilo uvedenih 462 PICC in 729 VAP, v letu 2020 pa 782 PICC in 741 VAP. Število uvedenih kratkotrajnih OVK je okrog 350 na leto.

Pri odstranitvi vseh vrst OVK ob sumu na okužbo za mikrobiološko preiskavo odvezamo konico katetra, pri VAP tudi izpirka notranjosti katetra. V letu 2019 je bilo pozitivnih 13,5 % konic, poslanih na mikrobiološko preiskavo, v letu 2020 pa 18,1 % (Tabela 2). Najpogosteje izolirane bakterije iz konic so bile *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* in *Enterobacter cloacae* kompleks. Glivnih izolatov ni bilo. Pri VAP je bila iz konice in izpirka notranjosti katetra vedno izolirana ista vrsta bakterije, kar dokazuje sočasno intraluminalno kolonizacijo katetra.

Tabela 2: Analiza konic OVK na OI v letih 2019 in 2020.

Leto	2019	2020
Število vseh konic OVK, poslanih na mikrobiološko preiskavo	126	171
Število (delež) pozitivnih konic	17 (13,5 %)	31 (18,1 %)
Število katetrskih seps	11	22
Število lokalnih okužb in/ali kolonizacij OVK	6	9

Legenda: OVK – osrednji venski kateter

Število katetrskih dni OVK s pozitivno konico je bilo zelo različno, od 8 do 815 dni. Mediana časa vstavitve za OVK v letu 2019 je bila 232 dni (medčetrtnski razmik [angl. *interquartile range*, IQR] 59–413), v letu 2020 pa 242 dni (IQR 97,5–311 dni). Največ bolnikov je imelo OVK zaradi parenteralne prehrane na domu (59,6 %) ali kemoterapije (32,1 %).

Nekateri bolniki s pozitivno konico OVK so imeli katetrsko sepso (potrjeno ali verjetno), drugi lokalno okužbo brez sepse in/ali kolonizacijo OVK. V letu 2019 je imelo katetrsko sepso 11 (64,7 %) bolnikov s pozitivno konico, v letu 2020 pa 22 (71 %). V večini primerov je bila vzrok za sepso okužba PICC ali VAP. Le pri enem bolniku v letu

2019 in enem v letu 2020 je bila vzrok okužba kratkotrajnega OVK. Zaradi zapletov VAP-sepse je v letu 2020 umrla ena bolnica, v letu 2019 nihče.

ZAKLJUČEK

Sepsa, ki jo povzroči žilni kateter ali vsa dna srčna elektronska naprava, poveča obolevnost, trajanje hospitalizacije, stroške zdravljenja in umrljivost. Pomembni so hitra klinična diagnoza, pravočasen in pravilen odvzem kužnin za mikrobiološke preiskave, ustrezna empirična antibiotična terapija in dosledno izvajanje preventivnih ukrepov.

LITERATURA

1. Böll B, Schalk E, Buchheidt D, et al. Central venous catheter-related infections in hematology and oncology: 2020 updated guidelines on diagnosis, management, and prevention by the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann Hematol*. 2021;100:239–59.
2. Baier C, Linke L, Eder M, et al. Incidence, risk factors and healthcare costs of central line-associated nosocomial bloodstream infections in hematologic and oncologic patients. *PLoS ONE*. 2020;15(1):e0227772.
3. Umscheid CA, Mitchell MD, Doshi JA, et al. Estimating the proportion of healthcare-associated infections that are reasonably preventable and the related mortality and costs. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011;32(2):101–14.
4. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*. 1994;62(3):915–21.
5. Timsit JF, Dubois Y, Minet C, et al. New materials and devices for preventing catheter related infections. *Ann Intensive Care*. 2011;1:34. Available from: <http://annalsofintensivecare.com/content/1/1/34>.
6. Janum S, Zingg W, Classen V, et al. Bench-to-bedside review: Challenges of diagnosis, care and prevention of central catheter-related bloodstream infections in children. *Crit Care*. 2013;17:238. Available from: <http://ccforum.com/content/17/4/238>.
7. Bouzidi H, Emirian A, Marty A, et al. Differential time to positivity of central and peripheral blood cultures is inaccurate for the diagnosis of *Staphylococcus aureus* long-term catheter-related sepsis. *J Hosp Infect*. 2018;99:192–9.
8. Bouza E, Alcalá L, Muñoz P, et al. Can microbiologists help to assess catheter involvement in candidaemic patients before removal? *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:E129–E135.
9. Park KH, Lee MS, Lee SO, et al. Diagnostic usefulness of differential time to positivity for catheter related candidemia. *J Clin Microbiol*. 2014;52(7):2566–72.
10. Marcos M, Soriano A, Inurrieta A, et al. Changing epidemiology of central venous catheter-related bloodstream infections: increasing prevalence of Gram negative pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:2119–25.
11. Steinberg JP, Coffin SE. Improving the central line-associated bloodstream infection surveillance definition: a work in progress. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;34:777–9.
12. Biehl LM, Huth A, Panse J, et al. A randomised trial on chlorhexidine dressing for the prevention of catheter bloodstream infections in neutropenic patients. *Ann Oncol*. 2016;27:1916–22.
13. Sousa B, Furlanetto J, Hutka M, et al. Central venous access in oncology: ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol*. 2015;26:152–68.

14. Mermel LA, Allon M, Bouza E, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;49(1):1–45.
15. Guembe M, Martin-Rabadan P, Echenagusia A, et al. Value of superficial cultures for prediction of catheter-related blood-stream infection in long-term catheters: a prospective study. *J Clin Microbiol* 2013;51(9):3025–30.
16. Sandoe JA, Barlow G, Chambers JB, et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of implantable cardiac electronic device infection. Report of a joint Working Party project on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC, host organization), British Heart Rhythm Society (BHRS), British Cardiovascular Society (BCS), British Heart Valve Society (BHVS) and British Society for Echocardiography (BSE). *J Antimicrob Chemother* .2015;70:325–59.
17. Ngo L, Nour D, Denman RA, et al. Safety and efficacy of leadless pacemakers: A systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc.* 2021;10:e019212. DOI: 10.1161/JAHA.120.019212.
18. Kumar V, Dhir S, Arora V. Subcutaneous implantable cardioverter-defibrillator (SICD) for sudden cardiac death – A case series. *IHJ Cardiovascular Case Reports (CVCR)*. 2022;6:59–62. DOI: org/10.1016/j.ihjccr.2022.03.001.
19. Westerman SB, El-Chami M. The subcutaneous implantable cardioverter defibrillator- review of the recent data. *J Geriatr Cardiol*. 2018;15:222–8. DOI: 10.11909/j.issn.1671-5411.2018.03.004.
20. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, et al. Clinical presentation, etiology and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med*. 2009;169:463–73.
21. Catanchin A, Murdock CJ, Athan E. Pacemaker infections: a 10-year experience. *Heart Lung Circ*. 2007;16(6):434–9.
22. Athan E, Chu VH, Tattevin P, et al. Clinical characteristics and outcome of infective endocarditis involving implantable cardiac devices. *JAMA*. 2012;307(16):1727–35.
23. Ostrowska B, Gkiouzevas S, Kurland S, et al. Device infections related to cardiac resynchronization therapy in clinical practice – An analysis of its prevalence, risk factors and routine surveillance at a single center university hospital. *Clin Cardiol* .2021;44:739–47.
24. Logar M, Tasič J, Žižek D, et al. Okužbe vsadnih srčnih elektronskih naprav. In: *Infekcijski endokarditis*. Ljubljana: Društvo slovenskih kardiokirurgov, 2019;62–8.
25. Viganego F, O'Donoghue S, Eldadah Z, et al. Effect of early diagnosis and treatment with percutaneous lead extraction on survival in patients with cardiac device infections. *Am J Cardiol* 2012;109:1466–71.
26. Sohail MR, Uslan DZ, Khan AH, et al. Management and outcome of permanent pacemaker and implantable cardioverter-defibrillator infections. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1851–9.
27. Uslan DZ, Dowsley TF, Sohail MR et al. Cardiovascular implantable electronic device infection in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2010;33:407–13.
28. Bongiorni MG, Tascini C, Tagliaferri E, et al. Microbiology of cardiac implantable electronic device infections. *Europace*. 2012;14:1334–9.
29. Khan TM, Siddiqui AH. Intra-Aortic Balloon Pump. 2022 Apr 28. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. PMID: 31194390.
30. Parisis H, Soo A, Al-Alao B. Intra aortic balloon pump: literature review of risk factors related to complications of the intraaortic balloon pump. *J Cardiothorac Surg*. 2011;6:147.
31. Hoffmann M, Bosshard A, Regli B, et al. Intra-aortic balloon pump infection: a neglected nosocomial infection? *Letters to the Editor*. *J Hosp Infect*. 2011;77:76–92.

Mitja Rak,¹ Samo Jeverica²

Odvzem kužnin pri okužbah v ortopediji

Collection of specimens in orthopedic infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: okužba kosti, okužba sklepov, okužba sklepnih vsadkov, diagnoza, sonikacija

Diagnostika okužb kosti, sklepov in sklepnih vsadkov ter fiksacijskih instrumentov je problematična, saj noben diagnostični test ni povsem zanesljiv. Rezultati mikrobioloških preiskav so odvisni od dejavnikov v predanalizni in analizni fazi, zato so pomembni tako pravilen izbor, odvzem in prenos kužnin kot tudi obdelava kužnin v mikrobiološkem laboratoriju. Sklepni punktat, biopsije in ortopedski vsadki so temeljne kužnine za dokazovanje in identifikacijo povzročiteljev okužb. Fistule in brisi tkiv so za diagnostiko manj primerni, saj kultivacija vzorcev fistul ne odraža natančno patogenov, ki povzročajo okužbe, z brisi pa tudi zajamemo manjše mikrobnobreme. Na uspeh kultivacije povzročiteljev okužb prav tako vpliva antibiotična terapija, zato jo dva tedna pred vzorčenjem prekinemo, če klinično stanje pacienta to dopušča. Število odvzetih vzorcev (biopsij) je pomembno, saj omogoča razlikovanje med povzročitelji okužb in kontaminanti. Vedno odvajamo 4 do 6 vzorcev, vsakega z ločenim setom sterilnih instrumentov. Mikroorganizmi na površini vsadka tvorijo biofilm, zato je pomembno diagnostično orodje za dokazovanje okužb sklepnih vsadkov tudi sonikacija.

ABSTRACT

KEY WORDS: bone infection, joint infection, joint implant infection, diagnosis, sonication

The diagnosis of infections of bones, joints and joint implants and fixation devices is problematic, as no diagnostic test is completely reliable. The results of microbiological examinations depend on the factors in the pre-analytical and analytical phase, therefore the correct selection, collection and transfer of infectious specimens as well as the processing of infectious specimens in the microbiological laboratory are important. Joint punctate, biopsies and orthopedic implants are the basic specimens used for identification of infectious agents. Fistulas and tissue swabs are less suitable for diagnosis, since the culture of fistula samples does not accurately reflect infection-causing pathogens, and swabs capture a smaller microbial load. The success of the cultivation of infectious agents is also affected by antibiotic therapy, therefore it should be stopped two weeks before sampling, depending on the patient's clinical condition. The number of samples

¹ Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Koper, Verdijeva ulica 11, 6000 Koper

² Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Novo mesto, Mej vrti 5, 8000 Novo mesto

taken (biopsies) is important, as it enables the differentiation between infectious agents and contaminants. The number of samples to be taken ranges from 4 to 6, each with a separate set of sterile instruments. Microorganisms on the surface of the implant form a biofilm, making sonication an additional important diagnostic tool for proving joint implant infections.

UVOD

Diagnostika okužb v ortopediji je velik izziv, saj znaki okužbe niso vedno jasno izraženi. Razlikovanje med septičnim in aseptičnim zapletom je zelo pomembno, saj se zdravljenje razlikuje. Zato potrebujemo zanesljive diagnostične metode, s katerimi lahko potrdimo ali ovržemo okužbo. V rutinski diagnostiki uporabljamo teste, kot so biokemična analiza krvi, slikovne metode, citološka preiskava sinovijske tekočine, histološka preiskava vzorcev obproteznega tkiva, kultivacijske in molekularne preiskave sinovijske tekočine, obproteznega tkiva in sonikatov. Vendar nobeden od naštetih testov ni povsem zanesljiv, zato za postavitev končne diagnoze najpogosteje uporabljamo kombinacijo različnih testov. Med naštetimi testi je zlati standard kultivacija obproteznega tkiva, saj je to edina metoda, s katero dokažemo povzročitelja okužbe, ga identificiramo in mu določimo občutljivost za antibiotike, kar lahko bistveno vpliva na nadaljnji potek zdravljenja.

Na diagnostiko vplivajo dejavniki v predanalizni in analizni fazi, zato je pomembno, da so vzorci pravilno izbrani, odvzeti in preneseni v mikrobiološki laboratorij. V prvem delu prispevka bomo razpravljali o nekaterih splošnih dejavnikih, ki vplivajo na mikrobiološko diagnostiko okužb v ortopediji. V drugem delu bomo sistematično predstavili najpogostejše ortopedске vzorce v mikrobiologiji.

SPLOŠNI DEJAVNIKI

Mikrobiološka diagnostika v ortopediji temelji na treh vrstah kužnin: sklepni punktati (sinovijska tekočina), biopsija obkostnih

tkiv in kosti (predoperativna in intraoperativna) ter ortopedskih vsadkov (proteze in osteosintetski material). Kužnine s področja fistul (tkivo ali bris) za diagnostiko niso primerne, saj kultivacija teh vzorcev pogosto ne odraža povzročiteljev okužbe, ampak kolonizacijske bakterije. Tudi brisi niso primeren način odvzema v ortopediji, saj tipično zajamejo premajhno količino kužnine, kar je v primeru okužb z majhno in neenakomerno porazdelitvijo mikrobnega bremena nezadostno (1).

Vse mikrobiološke vzorce je treba odvzeti aseptično, vsakega z ločenim setom sterilnih instrumentov. S tem preprečimo navzkrižno kontaminacijo vzorcev, kar je pomembno pri interpretaciji kulture, kjer se upošteva tako število odvzetih vzorcev kot tudi število pozitivnih vzorcev. Vsak vzorec položimo v ločeno sterilno posodo. Pri vzorčenju tkiv izbiramo mesta, ki so makroskopsko morfološko spremenjena oziroma nekrotična.

Pri kulturi je pomemben čas transporta, saj želimo v laboratorij prenesti žive bakterije. Velja načelo čim hitrejšega prenosa. Optimalen čas je znotraj 1 ure od odvzema, maksimalni dovoljeni čas je 24 ur. Če transport presega 4 ure, kužnine (tkiva) prelijemo s sterilno fiziološko raztopino, da preprečimo izsušitev vzorcev. Prenos poteka na sobni temperaturi v primerni transportni torbi, kjer lahko vzdržujemo stalno temperaturo. Po sprejemu v mikrobiološki laboratorij mora biti obdelava vzorcev opravljena čim hitreje, najpozneje v dveh urah.

Študije so pokazale, da s prekinitvijo antibiotične terapije dva tedna pred vzorčenjem izboljšamo občutljivost kultivacije

(2–5). Zato je treba 2 tedna pred odvzemu vzorcev antibiotično terapijo prekiniti, če je to glede na klinično stanje pacienta mogoče. Antibiotične kirurške profilakse pred odvzemu vzorcev ni treba izpuščati, lahko pa jo apliciramo po odvzemu vzorcev. Priporočila za odvzem in prenos ortopedskih vzorcev so povzeta v Tabeli 1.

SKLEPNA TEKOČINA

Sklepna tekočina je primerna kužnina tako pri diagnostiki okužb nativnih kot tudi umetnih sklepov. Pri izbiri diagnostične metode moramo upoštevati možne povzročitelje in epidemiološke podatke, starostno skupino, tip okužbe, prizadetost različnih sklepov. Sklepno tekočino odvajamo aseptično z igelno punkcijo.

Za potrebe mikrobiološke diagnostike odvajamo čim več kužnine (do 5 ml). V laboratoriju se tudi na podlagi količine vzorca odločamo, katere metode bomo uporabili, vsekakor pa je pomembno, da je

način pošiljanja vzorca usklajen z mikrobiološkim laboratorijem. V laboratoriju naredimo direktni razmaz, ki je pomemben zlasti pri diagnostični obdelavi sklepne tekočine nativnih sklepov in v katerem lahko določimo levkocite, kristale in mikroorganizme, odvisno od priprave vzorca in načina mikroskopiranja s svetlobnim ali polarizacijskim mikroskopom. Poleg tega kužnino nacepimo za konvencionalni način kulture (tekoča in trdna gojišča) in za kultivacijo v hemokulturnih stekleničkah. Predvsem slednja metoda je bistveno izboljšala detekcijo določenih patogenov, npr. *Kingella kingae*. Najpogostejša napaka, ki jo opažamo, je, da sinovijsko tekočino v laboratorij prenesejo samo v hemokulturni steklenički. V tem primeru je kužnina razredčena, združena z vsebino hemokulturne stekleničke, in zato neprimerna za druge diagnostične metode (npr. direktni razmaz, uporaba specialnih gojišč, molekularne metode).

Tabela 1: Priporočila za odvzem in prenos kužnin v ortopediji za mikrobiološke preiskave (povzeto po ref. (15)).

Tip vzorca	Št. vzorcev [količina]	Način odvzema	Transportna embalaža	Posebnosti
Sklepna tekočina	1 [> 1 ml]	Aseptično z igelno punkcijo ali biopsijo.	Sterilna posodica ali posebno transportno gojišče	Poslijemo kot samostojen vzorec. Če je punktata več kot 1 ml, ga lahko del vbrizgamo v stekleničko za hemokulturo.
Intraoperativno tkivo	4–6 [1 g]	En vzorec – en set odvzemnih instrumentov.	Sterilne posode	Treba je preprečiti izsušitev. Če bo prenos > 4 ure, vzorec prelijemo s sterilno fiziološko raztopino.
Ortopedski vsadek	Vse odstranjene komponente [volumen Ringerjeve raztopine odvisen od velikosti komponent in posode]	Aseptično odstranjeno protezo ali osteosintetski material položimo v sterilno vodotesno posodo in z Ringerjevo raztopino prekrijemo vso površino vsadka.	Ustrezna sterilna vodotesna in nepoškodovana posoda	Uporabimo čim manjšo posodo, tako da porabimo minimalno količino RR.
Protimikrobna terapija in čas vzorčenja			Prekinitev antibiotične terapije 2 tedna pred vzorčenjem	
Optimalni čas/temp. [maks. čas]			< 15 min./sobna temperatura [≤ 24 ur/sobna temperatura]	Čim prej pošljemo v mikrobiološki laboratorij

Avtorji priporočamo, da kužnino, če je je < 0,5 ml, nacepimo nerazredčeno na čokoladni agar in jo razredčimo s sterilno fiziološko raztopino ter nato nacepimo na druga gojišča. Kadar je kužnine 0,5–4 ml, naredimo direktni razmaz in nacepimo na trdna gojišča ter po možnosti v hemokulturno stekleničko (najprej aerobno – npr. pediatrično). Kadar je kužnine > 4 ml, jo nacepimo na vsa gojišča, vključno z aerobno in anaerobno hemokulturno stekleničko (6).

Pri sinovijski tekočini se čedalje pogosteje uporablja tudi molekularna diagnostika, bodisi širokospektralni PCR v kombinaciji s sekvenciranjem ali specifični PCR. Predvsem slednji lahko bistveno izboljša občutljivost detekcije posameznih povzročiteljev.

BIOPSIJE

Okužbe kosti in ortopedskih vsadkov so točkaste narave, zato za kultivacijo odvzamemo večje število vzorcev. Večje ko je število odvzetih vzorcev, večja je možnost za dokaz povzročitelja. Z večjim številom odvzetih vzorcev hkrati olajšamo razlikovanje med povzročitelji okužbe in kontaminanti, saj ločevanje zgolj na osnovi vrste ni mogoče, ker so najpogostejši povzročitelji okužb bakterije, ki tvorijo kožno mikrobioto. Občutljivost in specifičnost kultivacije je optimalna, če je odvzetih 4 do 6 vzorcev (7, 8). Ne glede na to, ali je klinični sum na okužbo utemeljen ali malo verjeten, odvzamemo isto število intraoperativnih vzorcev. Pri kroničnih okužbah je število odvzetih vzorcev posebno pomembno, ker je mikrobnobreme manjše.

V zadnjem obdobju številni centri uporabljajo kultivacijo biopsijskih vzorcev v hemokulturnih stekleničkah (9, 10). Na ta način so izboljšali izplen dokazanih povzročiteljev okužbe v tkivnih vzorcih v primerjavi s sonikacijo. Občutljivost in specifičnost takšnega načina kultivacije je bila v raziskavi Dudareva in sodelav-

cev 69- in 95-odstotna, v podobni raziskavi Yan in sodelavcev pa je bila občutljivost bodisi 66- ali 86-odstotna, odvisno od načina statistične obdelave rezultatov. V obeh primerih so uporabljali veliko število tkivnih vzorcev, 4 do 6, kar samo po sebi izboljša občutljivost kultivacije. Ob uporabi hemokulturnih stekleničk je treba biti previden pri detekciji bakterije *Cutibacterium acnes*, pogostega povzročitelja okužb vsadkov. V raziskavi Jeverica in sodelavcev ter El Sayed in sodelavcev so pokazali, da je za detekcijo te bakterijske vrste pomembna uporaba specifičnih medijev, saj je detekcija v hemokulturnih stekleničkah odvisna od klonalnega kompleksa *C. acnes* (11, 12). Zato je treba biti pred spremembo načina kultivacije previden in po možnosti uporabljati več različnih načinov kultivacije.

Pri interpretaciji kultur biopsijskih vzorcev je bistvenega pomena, da povzročitelja dokažemo v najmanj dveh različnih vzorcih (tj. ob upoštevanju menjave odvzemnih instrumentov), še zlasti kadar gre za nizko virulentne povzročitelje (npr. *C. acnes*, koagulazno negativni stafilokoki, difteroidi ...).

ORTOPEDSKI VSADKI

Vsadki so dolgo pomenili težavno kužnino za kultivacijo, saj ni bilo primerne metode, ki bi zagotavljala zanesljive rezultate. Inkubacija odstranjenih vsadkov neposredno v tekočih obogatitvenih gojiščih je zaradi velikosti vsadkov velik izziv, precejšnja pa je tudi možnost kontaminacije (13). Brisi površine vsadkov in strganje s skalpelom niso primerni, saj s takšnimi tehnikami vzorčenja ne zajamemo biofilma. Najbolj učinkovit način odstranjevanja biofilma s površine proteze je sonikacija. Ravno s to metodo so tudi ortopedski vsadki postali pomemben vzorec za mikrobiološko diagnostiko.

Odvzem vsadka

Aseptično odstranjeno protezo ali osteosintetski material položimo v sterilno vodotesno polipropilensko posodo ter dolijemo toliko Ringerjeve raztopine ali fiziološke raztopine, da v celoti prekrijemo površino vsadka. Sonikacijo izvajamo v ultrazvočni kopeli s primerno močjo in amplitudo valovanj ter časom trajanja. Med postopkom se na površini vsadka sprošča velika količina energije, zaradi česar se mikroorganizmi, ki so pritrjeni na protezo v obliki biofilma, odlepijo in sprostijo v tekočino, ki jo imenujemo sonikat.

Izziv pri sonikaciji

Izbira posode, v kateri je vsadek izpostavljen ultrazvočni kopeli, je ključna. Na začetku razvoja metode so uporabljali vrečke, ki so med procesiranjem vzorcev začele puščati. Specifičnost metode je bila nizka, saj so v kulturi porasle tudi okoljske bakterije (14). Z uporabo sterilnih polipropilenskih kontejnerjev so se težave s kontaminacijo med sonikacijo zmanjšale.

Posode so za večkratno uporabo, zato je pomembno, da jih po uporabi sterilno očis-

timo. Parno čiščenje pod tlakom sicer uniči mikroorganizme, vendar ostanki nukleinskih kislin lahko vplivajo na rezultate molekularnih analiz, zato je potrebna sterilizacija s plazmo, ki uniči tudi DNK.

Velikost posode za sonikacijo je prav tako zelo pomembna, saj je potrebno v večjo posodo naliti več tekočine, da v celoti prekrijemo vsadek. S tem pa razredčimo mikrobnobreme, zato so potrebni dodatni postopki zgoščevanja vzorca s centrifugiranjem. Vedno izberemo posodo, ki ustreza velikosti vsadka.

ZAKLJUČEK

Izbira, odvzem in prenos kužnin pomembno vplivajo na zanesljivost mikrobioloških preiskav. S pravilnim rokovanjem kužnin v predanalizni fazi povečamo verjetnost, da bomo dokazali in identificirali prave povzročitelje okužb, in ne kontaminantov. S tem zmanjšamo količino laboratorijskega dela in hkrati omogočimo, da bolniki v čim krajšem času prejmejo pravilno antibiotično terapijo, kar skrajša čas zdravljenja in zmanjša obremenitev zdravstvenega sistema.

LITERATURA

1. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis*. 2018 Aug 31;67(6):e1–94.
2. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 2007 Aug 16;357(7):654–63.
3. Malekzadeh D, Osmon DR, Lahr BD, Hanssen AD, Barbari EF. Prior use of antimicrobial therapy is a risk factor for culture-negative prosthetic joint infection. *Clin Orthop Relat Res*. 2010 Aug;468(8):2039–45.
4. Kim YH, Kulkarni SS, Park JW, Kim JS, Oh HK, Rastogi D. Comparison of infection control rates and clinical outcomes in culture-positive and culture-negative infected total-knee arthroplasty. *Journal of Orthopaedics*. 2015 Oct 1;12:S37–43.
5. Parvizi J, Erkocak OF, Della Valle CJ. Culture-Negative Periprosthetic Joint Infection. *JBJS*. 2014 Mar 5;96(5):430–6.
6. Body Fluid Cultures (Excluding Blood, Cerebrospinal Fluid, and Urine). In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2016 [cited 2022 Mar 8]. p. 3.5.1–3.5.9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555818814.ch3.5>.
7. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DWM, Simpson H, Peto TEA, et al. Prospective Evaluation of Criteria for Microbiological Diagnosis of Prosthetic-Joint Infection at Revision Arthroplasty. *J Clin Microbiol*. 1998 Oct;36(10):2932–9.
8. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment.

- Swiss Med Wkly. 2005 Apr 30;135(17-18):243-51.
9. Dudareva M, Barrett L, Figtree M, Scarborough M, Watanabe M, Newnham R, et al. Sonication versus Tissue Sampling for Diagnosis of Prosthetic Joint and Other Orthopedic Device-Related Infections. *J Clin Microbiol.* 2018 Dec;56(12):e00688-18.
 10. Yan Q, Karau MJ, Greenwood-Quaintance KE, Mandrekar JN, Osmon DR, Abdel MP, et al. Comparison of Diagnostic Accuracy of Periprosthetic Tissue Culture in Blood Culture Bottles to That of Prosthesis Sonication Fluid Culture for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection (PJI) by Use of Bayesian Latent Class Modeling and IDSA PJI Criteria for Classification. *J Clin Microbiol.* 2018 May 25;56(6):e00319-18.
 11. Jeverica S, El Sayed F, Čamerlik P, Kocjančič B, Sluga B, Rottman M, et al. Growth detection of *Cutibacterium acnes* from orthopaedic implant-associated infections in anaerobic bottles from BACTEC and BacT/ALERT blood culture systems and comparison with conventional culture media. *Anaerobe.* 2020 Feb;61:102133.
 12. El Sayed F, Jeverica S, Roux AL, Bauer T, Nkam L, Sivadon-Tardy V, et al. *Cutibacterium acnes* clonal complexes display various growth rates in blood culture vials used for diagnosing orthopedic device-related infections. *Anaerobe.* 2021 Dec 1;72:102469.
 13. Trampuz A, Osmon DR, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R. Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clin Orthop Relat Res.* 2003 Sep;(414):69-88.
 14. Trampuz A, Piper KE, Hanssen AD, Osmon DR, Cockerill FR, Steckelberg JM, et al. Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination. *J Clin Microbiol.* 2006 Feb;44(2):628-31.
 15. Rojnik A. Odvzem in transport vzorcev za bakteriološke, mikološke in parazitološke preiskave P-2-SN-III-NLZOH-CMM-08. [cited 2021 Sep 01]. Available from: https://www.nlzoh.si/wp-content/uploads/2021/03/Odvzem-in-transport-vzorcev-za-BAKTERIOLOSKE_MIKOLOSKE-IN-PARAZITOLOSKE-PREISKAVE.pdf [Internet]. NLZOH; 2021.

Andrej Kraševac Glaser,¹ Polona Maver Vodičar,² Vesna Breznik,³
Maja Bombek Ihan¹

Odvzem kužnin pri okužbah kože in ran

Skin and wound infections – sampling procedures

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: koža, rana, vzorčenje, Levinova tehnika, biopsija kože

Kronične okužbe kože in ran so velik javnozdravstveni problem zaradi visoke obolevnosti in smrtnosti, predvsem pri starejši populaciji, povzročajo pa tudi močan upad kakovosti življenja, socialno-ekonomskega stanja in glede na težavnost obolenja tudi veliko trpljenje bolnikov. V razvitem svetu se pojavljajo pri dveh odstotkih prebivalstva. Prizadete so lahko vse starostne skupine, vendar so zaradi pridruženih stanj, sekundarnih vzrokov (sladkorna bolezen tip 2, debelost) posebno ranljive starostne skupine, ki so pogosteje hospitalizirane. S tem se večja tudi verjetnost za okužbe z večkratno odpornimi mikroorganizmi, kar podaljša hospitalizacijo, poveča stroške zdravljenja in lahko vodi do nastanka sistemskih zapletov. Glede na čas celjenja lahko okužbe kože in ran razdelimo na akutne in kronične, glede na mikrobiološko breme normalne in patogene mikrobiote pa na kontaminirane, kolonizirane in okužene rane. Primarna diagnostika okužb kože in ran temelji na klinični in mikrobiološki diagnostiki, za slednjo pa je bistvena pravilna predanalizna faza – odvzem in prenos vzorca. V prispevku predstavljamo glavne indikacije za odvzem vzorca rane in najpogostejše metode odvzema s poudarkom na pravilni tehniki, saj je rezultat mikrobiološke diagnostike v največji meri odvisen od kakovosti vzorca.

ABSTRACT

KEY WORDS: skin, wound, sampling, Levine technique, skin biopsy

Chronic wound and skin infections are a major public health problem, due to increased morbidity and mortality in all age groups, but especially in the elderly population. They cause diminished quality of life, great suffering and decline in the socio-economic status. The prevalence of chronic wound and skin infections is 2% in the developed world. Infections are more prevalent in special groups of patients, with many comorbidities such as diabetes type 2 or obesity, an important contributing factor for infections are frequent hospitalizations.

¹ Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Center za medicinsko mikrobiologijo, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor. Korespondenca/correspondence: andrej.krasevac.glaser@nlzoh.si

² Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Univerzitetni klinični center Maribor, Oddelek za kožne in spolne bolezni, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

Chronic wound and skin infections can be divided into acute and chronic types – depending on the time needed for the wound to heal. In regard to the presence of normal or pathogenic microbiota, they are divided into contaminated, colonised, or infected wounds. The mainstay of diagnosing wound infections is clinical examination with correspondent wound sampling and microbiological diagnosis. For the latter the most important factor is the method of sampling and the correct transport of samples into the laboratory. In this paper we describe the major indications for wound sampling, and the most used techniques for sampling, the correct transport conditions, since the microbiological analysis and the interpretation of results depend on the quality of the sample.

UVOD

Okužbe kože in ran so veliko socialno-ekonomsko breme, pomenijo pa tudi močan upad kakovosti življenja ter pomemben delež obolevnosti in smrtnosti pri različnih populacijah, predvsem pri starostnikih. V razvitem svetu se pojavijo pri dveh odstotkih prebivalstva (2).

Koža je primarna zaščita telesa, ki nas varuje pred vdorom komenzalnih in patogenih mikroorganizmov s kože in sluznic (1). Ob poškodbi kože je izpostavljeno podkožno tkivo, s tem pa nastane prehransko bogato, vlažno in toplo okolje, ki je zelo ugodno za razmnoževanje mikroorganizmov. Povzročitelji okužb kože in ran so zelo različni, čedalje večji pomen imajo tudi anaerobni mikroorganizmi (2). Pestrost povzročiteljev je odvisna predvsem od vrste rane, njene lokacije in globine, kakovosti tkivne perfuzije, limfatične in venske drenaže ter od predhodnega protimikrobnega zdravljenja in delovanja imunskega sistema gostitelja (3).

RAZDELITEV RAN GLEDE NA ČAS CELJENJA

Rane glede na čas celjenja delimo na akutne in kronične. Akutne nastanejo zaradi poškodbe zdrave kože in se praviloma zacelijo brez zapletov v razmeroma kratkem času. Mednje uvrščamo kirurške rane, opeklinske rane, ureznine, abrazijske rane, ugriznine in akutne rane s hujšim potekom (raztrganine, poškodbene

rane s strelnim orožjem in zmečkanine). Akutne rane se celijo po zakonih primarnega celjenja, zacelijo se v kratkem obdobju 1–2 tednov, protimikrobno zdravljenje večinoma ni potrebno (rane so čiste, brez tujkov ali nekrotičnega tkiva). Izjema so hude travmatske rane zaradi velike količine nekrotičnega tkiva in visokega deleža mikrobiote, kjer je potrebna kirurška oskrba rane in protimikrobno zdravljenje (4, 3).

Kronične rane so tiste, ki se zaradi različnih, večinoma endogenih vzrokov slabo celijo. V stroki ni natančne opredelitve, po kako dolgem obdobju definiramo rano kot kronično. Večina avtorjev je mnenja, da je to rana, ki se ne zaceli po 4–6 ali celo 8 tednih. Razjede zaradi pritiska ali preležanine nastanejo na izpostavljenih mestih zaradi delovanja zunanega pritiska (peta, gležnji, križ). Pomembni dejavniki za nastanek kroničnih ran pa so tudi moteno delovanje arterijskega (periferna arterijska okluzivna bolezen, PAOB) ali venskega (venska insuficienca) obtoka in presnovne motnje (sladkorna bolezen tipa 2). Drugi dejavniki, ki vplivajo na tveganje za nastanek kroničnih ran, so starost, debelost, kajenje, slaba prehranjenost, imunosupresivne bolezni in polifarmacija (4).

OKUŽBE RAN

Rane glede na mikrobiološko breme normalne ali patogene mikrobiote delimo na

kontaminirane, kolonizirane in okužene. Vsaka rana (akutna ali kronična) je kontaminirana z bakterijami iz treh glavnih virov: i) okolja – domačega ali bolnišničnega (eksogeni mikroorganizmi iz zraka ali vneseni ob travmatski poškodbi), ii) kože v okolici (različni pripadniki gostiteljeve naravne kožne mikrobiote) ali iii) sluznice (endogeni vir je mikrobiota gostiteljevih sluznic, predvsem gastrointestinalne, orofaringealne in genitourinarne). Celjenje rane zaradi kontaminacije ni mogoče, mikroorganizmi se ne razmnožujejo oziroma ne perzistirajo, protimikrobno zdravljenje ni potrebno (6).

Mikroorganizmi se lahko začnejo aktivno razmnoževati zaradi ugodnih razmer v rani (vlaga, temperatura, nekrotično tkivo), takšna rana postane kolonizirana. Celjenje podobno kot pri kontaminaciji ni mogoče, prav tako ni potrebno protimikrobno zdravljenje. Posebna stopnja kolonizacije je kritična kolonizacija rane, ki jo lahko določimo le s kvantitativno mikrobiološko diagnostiko in pri kateri je prisotnih 10^5 enot, ki tvorijo kolonije (CFU) mikroorganizmov v gramu vzorca tkiva, odvzetega z biopsijo. Mikrobiota se na dnu rane aktivno razmnožuje, tvori biofilm, mikroorganizmi izražajo različne virulentne dejavnike, kar poslabša celjenje rane. Če kritično kolonizirana rana ni ustrezno oskrbljena, se razvije lokalna okužba (6).

Proces od kolonizacije rane do okužbe je odvisen od virulence in koncentracije mikroorganizmov oziroma njihovega volum-

na, pomembni pa so tudi lokalni in sistemski dejavniki. Okužba rane je lahko lokalna, kar prepoznamo po klasičnih znakih vnetja (rdečina, toplota, oteklina, gnojni izcedek, nova bolečina in gnojav vonj iz rane). Iz lokalno okužene rane se lahko razvije razširjena okužba (eritem, ki se širi, vnetje limfatičnega žilja, krepitacije, razpad rane, slabost, izguba apetita) in sistemska okužba s kliničnimi znaki sepse ali septičnega šoka (1).

INDIKACIJE ZA ODVZEM VZORCA RANE

Vsake rane (akutne ali kronične) ni potrebno vzorčiti za mikrobiološko diagnostiko. To še zlasti velja, če je rana mirna, se normalno celi in je brez kliničnih znakov vnetja. Leta 2016 je International Wound Infection Institute (IWII) izdal publikacijo *Wound infection in clinical practice*, v kateri so bile oblikovane indikacije za odvzem kužnin pri akutnih in kroničnih okužbah rane, predstavljene v Tabeli 1 (6).

ODVZEM VZORCEV

Poznamo kvalitativne (globoki bris rane – netravnatski odvzem) in kvantitativne tipe odvzemov (biopsija tkiva rane in kože s t. i. punch biopsijo, aspiracija tekočine podkožne kolekcije, kiretaža rane – travmatski odvzem). Idealnega vzorca pri okužbah kronične rane ni, prav tako ni soglasja o tem, katera metoda je najboljša, saj nobena tehnika odvzema ne zagotavlja boljše občutljivosti in specifičnosti. Nobena metoda ne pokrije celotnega spektra

Tabela 1: Indikacije za odvzem vzorca rane.

Indikacije za odvzem vzorca rane
Akutne rane s klasičnimi znaki okužbe (rdečina, toplota, bolečina, edem)
Kronične rane s kliničnimi znaki širjenja ali sistemske okužbe (sepsa ali septični šok, odvzem hemokultur in drugih kužnin glede na klinično sliko)
Okužene akutne ali kronične rane, ki se ne zdravijo oziroma se slabšajo kljub ustreznemu protimikrobnemu zdravljenju
Indikacije za odvzem kužnin pri presejalnem testiranju na večkratno odporne mikroorganizme

patogenih mikroorganizmov v rani in tkivu, problematičen je tudi odvzem vzorcev rane, kjer se nahaja biofilm. Pravilen način odvzema tako pri biopsiji kot pri brisu rane je ključna predanalizna točka za pravilno identifikacijo patogenov in terapevtsko obravnavo bolnika (6).

KVALITATIVNE METODE VZORČENJA

Najpogostejši vzorec je globoki bris rane. Tehnika odvzema ima glede na kvantitativno mikrobiološko diagnostiko več prednosti: odvzem vzorca je preprost, vzorčenje lahko ponovimo, postopek je ob pravilni tehniki in usposabljanju zdravstvenega osebja mogoče standardizirati. Resni neželeni učinki vzorčenja so redki. Opisani sta dve ključni tehniki vzorčenja rane: pri Levinovi tehniki si izberemo 1 cm² veliko območje živega dela očiščene rane, ki ga pobrišemo z bombažnim ali drugače sestavljenim brisom (dakronski, rayonski bris) in z rotacijo brisa 5 sekund ter izvajanjem pritiska na rano odvzamemo vzorec (9). Drugi, redkeje uporabljen način vzorčenja z brisanjem je Z-tehnika. Pri tej tehniki z brisom v cikcak gibanju pobrišemo celotno rano, treba pa je pobrisati najmanj 10 točk rane brez doti-

kanja robov, saj sicer lahko bris kontaminiramo z normalno mikrobioto kože (9). Razlika med obema tehnikama je predvsem v zajetju serozne tekočine. Pri Levinovi tehniki pridobimo večjo količino serozne tekočine, ki v določeni meri predstavlja mikroorganizme iz globine tkiva, pri Z-tehniki pa je količina serozne tekočine manjša. Pri obeh metodah po brisanju vzorec vstavimo v bakteriološko transportno gojišče in ga na sobni temperaturi v najkrajšem možnem času s pravilno izpolnjenim spremnim listom dostavimo v laboratorij (7, 8, 9).

Primerno mesto vzorčenja mora biti dobro očiščeno. Vzorčimo živo tkivo, ki je klinično okuženo. Odstraniti je treba vse nekrotično tkivo, tujke in gnojni eksudat z umivanjem pod tekočo vodo ali s sterilno izotonično fiziološko raztopino, lahko si pomagamo z mehanskim odstranjevanjem neživega tkiva (kiretaža, skalpel, škarje, ultrazvok ali ablativni laser). Podobno kot pri načinu vzorčenja tudi pri načinu čiščenja ran ni soglasja. Najpogostejši način umivanja je s tekočo vodo. Antiseptiki (natrijev hipoklorit, poliheksametilen bigvanid / BHMB/, povidon jod) se za diagnostično čiščenje rane ne uporabljajo zaradi delovanja na biofilm in patogene mikroorganizme v

Tabela 2: Navodilo za odvzem vzorca po Levinovi metodi.

Korak	Poseg	Opomba
1	Očistimo rano, odstranimo mrtvino	S tekočo vodo ali sterilno fiziološko raztopino, fizikalna odstranitev mrtvine s škarjami, skalpelom, kireto ...
2	Pripravimo sterilni bris in ga navlažimo s sterilno fiziološko raztopino	Pripravimo si vse pripomočke (nesterilne rokavice, sterilni zloženci, bris s transportnim gojiščem). Bris navlažimo predvsem v primeru suhih ran.
3	Izberemo mesto vzorčenja	Izberemo najbolj čist, živ del rane, ne vzorčimo nekrotičnega dela rane ali gnoja.
4	Levinova tehnika vzorčenja	Bolniku razložimo poseg. Pobrišemo 1 cm ² veliko področje živega dela rane. Brišemo 5 sekund, pri tem bris rotiramo in z njim izvajamo pritisk na rano. Po vzorčenju bris vstavimo v bakteriološko transportno gojišče.
5	Pravilno označimo vzorec in izpolnimo spremni list	–
6	Končna oskrba rane	–

rani. Nepravilno očiščena rana je kontaminirana z normalno mikrobioto kože, rezultati mikrobiološke diagnostike pa so zato lahko zavajajoči, saj težko razlikujemo patogene mikroorganizme v tkivu in rani od normalne mikrobiote kože. Pravičen algoritem odvzema brisa rane za Levinovo tehniko je prikazan v Tabeli 2 (3, 5, 9, 10).

KVANTITATIVNE METODE VZORČENJA

Med kvantitativne metode vzorčenja spadajo invazivno odvzeti vzorci kože in kroničnih ran (globoka biopsija tkiva, igelna aspiracija tekočinske kolekcije v tkivu, kiretaža rane in aspiracija tekočine iz rane). V primerjavi s preprostejšim odvzemom globokega brisa rane se kvantitativni odvzem vzorca izvaja redkeje, saj je vzorčenje povezano z več neželenimi učinki in zapleti, potrebno je višje izobraženo osebje, mikrobiološka diagnostika je dražja in daljša. Globoka tkivna biopsija oz. »punch« biopsija in aspiracija kolekcije tekočine iz podkožja se izvajata s posebnim kirurškim instrumentarijem, oblikovanim za odvzem vzorcev kože in podkožja, ali s sterilno injekcijsko brizgo. Predstavljata zlati standard vzorčenja kroničnih ran in kože. Prednost biopsije ali aspiracije tekočine je možnost kvantificiranja mikroorganizmov v tkivu ali v tekočini, rezultat mikrobiološke diagnostike pa podamo v obliki CFU/g tkiva ali CFU/ml tekočine. Mejna vrednost, ki določa okužbo v tkivu, odvzetem s »punch« biopsijo, je $>10^5$ CFU/g tkiva (1). Priprava rane oziroma diagnostično čiščenje rane je enako kot pri odvzemu globokega brisa, le da je območje, na katerem bomo izvajali poseg, pogosto treba omrtvičiti z lokalnim anestetikom. Posodica za tkiva mora biti primerne velikosti. Vzorec navlažimo z nekaj kapljicami sterilne fiziološke raztopine, da preprečimo izsušitev tkiva med prenosom, vendar količina ne sme biti prevelika, saj bo sicer

kvantifikacija mikroorganizmov zaradi redčenja vzorca napačna. Vzorce takoj pošljemo v laboratorij. Pri kvantitativnih metodah vzorčenja so možni različni zapleti, med najpomembnejšimi so strah bolnika pred posegom, neprijetnost, bolečina ali krvavitev na mestu odvzema, redkeje lahko pride do razsoja patogenih mikroorganizmov v sistemski obtok in spremembe lokalne okužbe v sistemsko (8, 10, 11).

ZAKLJUČEK

Kronične rane so velik socialnoekonomski in medicinski problem, saj bistveno zmanjšajo kakovost življenja in skrajšajo bolnikovo življenjsko dobo. Pri začetni obravnavi kroničnih ran je bistvena diagnostična metoda klinični pregled, mikrobiološka diagnostika kroničnih ran pa ima pomen pri ranah, ki se slabo celijo in so okužene s številnimi aerobnimi in anaerobnimi mikroorganizmi, včasih je za slabše celjenje kriv tudi nastanek biofilma ali prisotnost večkratno odpornih mikroorganizmov. Za najbolj ustrezno terapevtsko obravnavo bolnika je ključen kakovosten rezultat mikrobiološke diagnostike, zanj pa je izredno pomembna tudi kakovostna predanalizna faza, katere pomemben del je pravilno izpolnjen spremni list, predvsem pa pravilno odvzet vzorec. Zlati standard je globoka biopsija rane, vendar se zaradi neželenih učinkov in potrebe po posebni usposobljenosti zdravstvenega osebja za to metodo vseeno najpogosteje uporablja globoki bris rane, ki je ob pravilni izvedbi po Levinovi metodi enakovreden biopsiji.

LITERATURA

1. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):244–269. DOI: 10.1128/CMR.14.2.244-269.2001.
2. Stallard Y. When and How to Perform Cultures on Chronic Wounds? *J Wound, Ostomy Cont Nurs.* 2018;45(2):179–186. DOI: 10.1097/WON.0000000000000414.
3. Petrovec M et al. 9. Baničevi dnevi: Okužbe pri starostnikih. 2017 Bombek Ihan M, Breznik V., Rupnik M. Mikrobiološka obravnava kronične rane; 149–155.
4. Bonham PA. Swab cultures for diagnosing wound infections: A literature review and clinical guideline. *J Wound, Ostomy Cont Nurs.* 2009;36(4):389–395. DOI: 10.1097/WON.0b013e3181aaef7f.
5. Navarro-San Francisco C, Ruiz-Garbjosa P, Cantón R. The what, when and how in performing and interpreting microbiological diagnostic tests in skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2018;31(2):104–112. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000433.
6. International Wound Infection Institute (IWII) Wound infection in clinical practice. Wounds International 2016.
7. Silbert S, Gostnell A, Kubasek C, Widen R. Evaluation of the BD MAX™ StaphSR Assay for Detecting MRSA and MSSA in ESwab Collected Wound Samples. *J Clin Microbiol.* Published online 2017;JCM-00641.
8. Haalboom M, Blokhuis-Arkes MHE, Beuk RJ, et al. Culture results from wound biopsy versus wound swab: does it matter for the assessment of wound infection? *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(5):629.e7–629.e12. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.08.012.
9. Ward D, Holloway S. Validity and reliability of semi-quantitative wound swabs. *Br J Community Nurs.* 2019;24(December):S6–S11. DOI: 10.12968/bjcn.2019.24.Sup12.S6.
10. Copeland-Halperin LR, Kaminsky AJ, Bluefeld N, Miraliakbari R. Sample procurement for cultures of infected wounds: A systematic review. *J Wound Care.* 2016;25:s4–s10. DOI: 10.12968/jowc.2016.25.sup4.s4.
11. Gjødsbøl K, Skindersoe ME, Christensen JJ, et al. No need for biopsies: Comparison of three sample techniques for wound microbiota determination. *Int Wound J.* 2012;9(3):295–302. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2011.00883.x.

Julija Germ,¹ Katja Seme¹

Odvzem in transport vzorcev za mikrobiološke preiskave pri okužbah spodnjih dihal

Sample collection and transport for microbiological examination of lower respiratory tract infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: diagnostika okužb spodnjih dihal, odvzem vzorca, shranjevanje in transport, vpliv na rezultat preiskave

Z mikrobiološko diagnostiko poskušamo pri obravnavi okužb spodnjih dihal opredeliti povzročitelja okužbe, občutljivost bakterijskih povzročiteljev za antibiotike in spremljati epidemiološko stanje. Kljub napredku v razvoju mikrobioloških diagnostičnih metod je osnovni pogoj za kakovosten rezultat preiskave odvzem ustreznega vzorca v ustreznih okoliščinah ter primerno shranjevanje in transport vzorca, ki je odvisen od pričakovane povzročitelja okužbe (npr. virusi, tipični ali atipični bakterijski povzročitelji okužbe, anaerobne bakterije). Interpretacijo v diagnostiki povzročitelja okužb spodnjih dihal oteži dejstvo, da je področje zgornjih dihal, ki se mu pri odvzemu vzorca iz spodnjih dihal dejansko ne moremo izogniti, bogato z normalno mikrobioto. Predolg transport, predhodno antibiotično zdravljenje ali neustrezno izbrana metoda lahko vplivajo na rezultat preiskave.

ABSTRACT

KEY WORDS: diagnosis of lower respiratory tract infection; sample collection, transport and storage; improving diagnosis

Microbiological diagnosis of lower respiratory tract infections enables the identification of an etiologic agent of the infection and susceptibility testing for antimicrobials; it also serves for epidemiological surveillance. Notwithstanding the progress in the development of microbiological diagnostic methods, collection, transport and storage of samples are of major importance for an accurate report. Another challenge in the result interpretation of a respiratory tract infection diagnosis is the rich normal microbiota of the upper respiratory tract area that cannot be completely avoided when collecting samples from the lower respiratory tract. Long transport, prior antimicrobial treatment or an inappropriately chosen method can affect the result of the examination.

¹ Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana. Korespondenca/correspondence: julija.germ@mf.uni-lj.si

UVOD

Okužbe dihal sodijo med najpogostejše okužbe, kar ni presenetljivo, saj so zgornja dihalna v tesnem stiku z zunanjim svetom (1, 2). Sluznica dihal služi kot učinkovita pregrada za mikroorganizme, hkrati pa je področje, bogato z aerobnimi in anaerobnimi bakterijami. Do kolonizacije zgornjih dihal z mikroorganizmi pride že v prvem letu življenja; poleg normalne mikrobiote pa lahko žrelo kolonizirajo tudi potencialno patogene bakterije, kot so betahemolitični streptokoki skupine A, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* in *Moraxella catarrhalis*, ki so lahko prisotni trajno ali občasno, v redkih primerih pa povzročajo bolezen. Virusi zgornjih dihal praviloma ne kolonizirajo (1, 3). Okužbe spodnjih dihal najpogosteje povzročajo bakterije in virusi, medtem ko se z drugimi mikroorganizmi (glive, paraziti) srečujemo v določenih okoliščinah, npr. pri osebah z okvarjenim imunskim sistemom (2).

S sodelovanjem lečечега zdravnika in mikrobiologa lahko pridobimo optimalen vzorec za preiskave in ustrezno interpretiramo izvid.

OKUŽBE SPODNJIH DIHAL, ODVZEM IN TRANSPORT KUŽNIN

A. Bronhitis in bronhiolitis

Akutni bronhitis je samoomejujoče se vnetje velikih in srednje velikih dihalnih poti, ki ga večinoma povzročajo virusi, v manjšem deležu pa dokažemo bakterijski vrsti *Mycoplasma pneumoniae* in *Chlamydia pneumoniae*. Diagnoza je praviloma postavljena klinično, ob sumu na bakterijske povzročitelje ali virus influence se v prvih dneh bolezni odvzamejo kužnine iz nosno-žrelnega prostora ali žrela (1–4). Akutno poslabšanje kroničnega bronhitisa povzročajo virusi in bakterije *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Pseudomonas*

aeruginosa. Bris nosno-žrelnega prostora za kultivacijo bakterij ni optimalen, saj je v primeru bakterijske rasti težko ločiti, ali gre za povzročitelja bolezni ali kolonizacijo. Ustreznejši kužnini sta izzvani izmeček in seč za določitev topnega antigena za *S. pneumoniae*. Povzročitelja bronhitisa dokažemo v 5–40 % primerov (1, 3, 4). Bronhiolitis je najpogostejša okužba spodnjih dihal pri otrocih do drugega leta starosti, povzročitelji so večinoma virusi, predvsem respiratorni sincicijski virus (RSV). Pri starejših otrocih in mlajših odraslih s paroksizmalnim kašljem pomislimo na oslovski kašelj (1, 3, 4).

Za odvzem brisa nosno-žrelnega prostora vstavimo tanek bris skozi nos po dnu nosne votline do zadnje stene nosnega dela žrela in ga nekajkrat nežno zavrtimo okoli osi. Bris za molekularni dokaz virusov vstavimo v 2–3 ml transportnega gojišča za viruse, v laboratorij ga prenesemo v dveh urah pri sobni temperaturi (ST) ali najkasneje v 24–48 urah pri 4 °C. Bris za kultivacijo bakterij in gliv vstavimo v transportno gojišče Amies/Stuart, ki ni hranilno, a omogoča, da bakterije ostanejo viabilne, ob čemer se le malo pomnožujejo. Bris prenesemo v laboratorij v dveh urah ali najkasneje v 24 urah pri ST. Bris brez transportnega gojišča za kultivacijo bakterij in gliv takoj po odvzemu prenesemo v laboratorij, shranjevanje oz. daljši transport ni dovoljen. Alternativni kužnini za dokaz mikroorganizmov v diagnostiki bronhitisa sta izpirek žrela – bolnik spere usta z vodo, nato 30 sekund grgra 2 ml sterilne fiziološke raztopine in jo izpljune v sterilno posodico – ter izpirek nosno-žrelnega prostora. Tako pridobljene kužnine v sterilni posodici prenesemo v laboratorij v dveh urah pri ST, v primeru daljšega transporta pa v 24 urah pri 4 °C (3, 5–7).

Za dokaz *C. pneumoniae* in *M. pneumoniae* dakronski bris vstavimo v žrelo in ga močno podrgnemo po sluznici nebnic in žrela. Bris v tekočem gojišču za mikoplaz-

me in viruse prenesemo v laboratorij v dveh urah pri ST ali 4 °C, pri 4 °C je vzorec lahko shranjen do 48 ur (3, 5–7). Alternativne kužnine pri intubiranem bolniku so aspi-

rat traheje, bronhoalveolarni lavat (BAL) ali bronhoskopski vzorec z zaščitenim krtačenjem (angl. *protected specimen brush, PSB*) (3, 10) (Tabela 1).

Tabela 1: Laboratorijska diagnostika, odvzem in transport kužnin ob sumu na bronhiolitis, bronhitis in oslovski kašelj.

Povzročitelj	Preiskava	Najprimernejša kužnina	Prenos
Bronhiolitis			
Virusi	PCR, dokaz virusnega antigena	Izpirek nosu, bris NF, izpirek NF, izpirek ali bris žrela	VTG ali SP, ≤ 2 uri pri ST, najkasneje v 24–48 urah pri 4 °C
Akutni bronhitis			
Bakterije			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	PCR	Bris žrela, bris NF, aspirat NF	Transportno gojišče, ≤ 2 uri pri ST
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	PCR	Bris NF	Transportno gojišče, ≤ 2 uri pri ST
Virusi		Izpirek nosu, bris NF, izpirek NF, izpirek ali bris žrela	VTG ali SP, ≤ 2 uri pri ST, najkasneje v 24–48 urah pri 4 °C
Akutno poslabšanje kroničnega bronhitisa			
Bakterije			
<i>Haemophilus influenzae</i>	Barvanje po Gramu, aerobna kultura	Izmeček	SP, < 2 uri pri ST, 2–24 ur pri 4 °C
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Barvanje po Gramu, aerobna kultura	Izmeček	SP, < 2 uri pri ST, 2–24 ur pri 4 °C
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	PCR	Bris žrela, NF, aspirat NF	Transportno gojišče, ≤ 2 uri pri ST
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	PCR	Bris NF	Transportno gojišče, ≤ 2 uri pri ST
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Barvanje po Gramu, aerobna kultura, Dokaz topnega antigena v seču	Izmeček Spontano mokrenje, najmanj 10 ml seča	SP, < 2 uri pri ST, 2–24 ur 4 °C SP, ≤ 2 uri pri ST, 24 ur do 14 dni pri 4 °C ali –20 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Barvanje po Gramu, aerobna kultura	Izmeček	SP, < 2 uri pri ST, 2–24 ur pri 4 °C
Virusi	PCR	Izpirek nosu, bris NF, izpirek NF, izpirek/bris žrela	VTG ali SP, ≤ 2 uri pri ST, najkasneje v 24–48 urah pri 4 °C
Oslovski kašelj			
<i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i>	PCR in/ali kultura	Bris NF (krtačni bris v tekočem gojišču Amies-ESwab), aspirat NF	≤ 2 uri pri ST, najkasneje v 24–48 urah pri 4 °C
	PCR	Bris NF (konica brisa iz dakrona, rajona, poliuretana ali poliestra), aspirat NF	V 24 urah pri 4 °C
	Kultura	Bris NF v selektivnem gojišču Regan-Lowe ali Bordet-Gengou), aspirat NF	≤ 2 uri oz. najkasneje v 24 urah pri ST

Legenda: NF – nazofarinks (nosno-žrelni prostor), VTG – virusno transportno gojišče, SP – sterilna posodica, ST – sobna temperatura

B. Pljučnica

Pljučnica je akutna okužba dihal, ki prizadene distalne dele pljuč, najpogosteje tudi alveole. Zunajbolnišnična pljučnica (ZBP) se pojavi v okolju zunaj bolnišnice ali v prvih 48 urah po sprejemu v bolnišnico. Najpogosteje jo povzročata bakterijska vrsta *S. pneumoniae*, sledijo respiratorni virusi in bakterijske vrste *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* ter vrste iz reda *Enterobacteriales* in rodu *Pseudomonas* (2, 11, 12). V do 30 % primerov so ugotavljali mešane okužbe z bakterijami in virusi (13). Bolnišnična pljučnica je opredeljena kot pljučnica, ugotovljena ≥ 48 ur od sprejema v bolnišnico. Če se pojavi več kot 48 ur po endotrahealni intubaciji, jo opredelimo kot pljučnico, povezano z mehanskim predihavanjem (angl. *ventilation associated pneumonia* – VAP). Najpogostejši povzročitelji so bakterije, ki jih najdemo v bolnišničnem okolju – *S. aureus*, enterobakterije, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* in *Stenotrophomonas maltophilia*, ki so lahko večkratno odporne. Problem pljučnice, povezane z mehanskim predihavanjem, je v tem, da je intubacija povezana z mikrobno kolonizacijo spodnjih dihal in se pojavi že po 12 urah. Tudi z invazivnim odvzemom kužnin iz spodnjih dihal se ne moremo povsem izogniti kontaminaciji kužnine z izločki in mikrobioto ustno-žrelnega prostora, hkrati pa nimamo idealne metode, s katero bi lahko ločili kolonizatorje od dejanskih povzročiteljev okužbe (2, 11, 12). Zato se je v nekaterih okoljih uveljavilo priporočilo kvantitativne kulture teh vzorcev, s čimer bi lažje razlikovali med kolonizirajočimi bakterijami in tistimi, ki dejansko povzročajo okužbo, pri čemer so mejne vrednosti odvisne od vzorca in znašajo 10^{5-6} CFU/ml za aspirat traheje, 10^4 CFU/ml za BAL ter 10^3 CFU/ml za zaščiteno krtačenje. Specifičnost preiskave na ta način sicer izbolj-

šamo, a ima tovrstna obdelava kužnin iz spodnjih dihal tudi številne diagnostične omejitve (2). Rutinska mikrobiološka diagnostika pri ambulantno zdravljenih bolnikih se ne priporoča, izjema je pregled izmečka v primeru odpovedi zdravljenja oz. diagnostika po presoji lečečega zdravnika glede na bolnikova pridružena stanja, specifične epidemiološke podatke ali predhodno antibiotično zdravljenje. Pri bolnišnično obravnavani pljučnici se praviloma odvzamejo kužnine za mikrobiološke preiskave pred uvedbo antibiotika (2, 11). Najnovejše smernice ameriškega združenja za infekcijske bolezni skupaj z ameriškim torakalnim združenjem (angl. *Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society, IDSA/ATS*) navajajo neinvazivno odvzem kužnin (14).

Ustrezne kužnine za diagnostiko povzročiteljev pljučnice so vzorci iz spodnjih dihal, ki jih ločimo na pridobljene neinvazivno (izmeček, endotrahealni aspirat, mini-BAL) in invazivno (BAL, zaščiteno krtačenje z bronhoskopijo in brez nje, bronhoskopsko pridobljen košček tkiva). Bolniki s pljučnico, ki jo povzročajo klamidije, legionela, mikoplazma in virusi, izmečka pogosto sploh nimajo. Pri pljučnici, ki je obravnavana v bolnišnici, so v pomoč tudi kužnine s primarno sterilnih mest, npr. kri za hemokulturo in vzorec plevralnega izliva, pridobljen s punkcijo. V vzorcu seča določimo topni antigen za dokaz *S. pneumoniae* in *L. pneumophila* (2, 3). Pri sumu na aspiracijsko pljučnico, kjer pričakujemo mešano aerobno-anaerobno bakterijsko okužbo, je optimalen vzorec spodnjih dihal pridobljen z zaščitnim krtačenjem (3).

Kužnine, odvzete s primarno nesterilnega področja

Neinvazivno odvzete kužnine

- Izmeček (sputum) je najpogosteje odvzeta kužnina v diagnostiki pljučnice, ki jo povzročajo tipični bakterijski povzro-

čitelji. Najprimernejši je prvi jutranji izmeček. Bolnik si pred odvzemom temeljito spere usta in z zobno krtačko umije zobe. Po potrebi odstrani zobno protezo. V sterilno posodico z navojem globoko izkašlja vsaj 1 ml izmečka. Zdravstveni delavec bolniku pokaže pravilno ravnanje s posodico, da se izogne kontaminaciji. Za ustrezno interpretacijo rezultata je izrednega pomena, da pridobimo izmeček iz spodnjih dihal, ki ni kontaminiran z ustno mikrobioto, kar ocenimo v laboratoriju z mikroskopskim pregledom vzorca izmečka po citoloških kriterijih. Nadaljnja obravnava neustreznega vzorca (več kot 10 epitelijskih celic in manj kot 25 polimorfonuklearnih celic/vidno polje pri 10-kratni povečavi) se ne priporoča. Izmeček prenesemo v laboratorij v dveh urah pri ST ali najkasneje v 24 urah pri 4 °C (1, 3, 14).

- Izzvani izmeček (inducirani sputum): induciranje izmečka je metoda, s katero lahko pri bolniku, ki slabo izkašlja je oz. nima izmečka, usposobljeno zdravstveno osebje spodbudi izločanje sluzi iz dihalnih poti. Vzorec, ki ga običajno obkašlja izločimo iz ust, imenujemo izzvani izmeček in izhaja pretežno iz sapnika in večjih bronhov, medtem ko je delež iz perifernih dihalnih poti manjši (15). Inducirani izmeček se najpogosteje pridobi z vdihavanjem aerosolov hipertonične solne raztopine, ki jih proizvaja ultrazvočni razpršilec. Kapljice solne raztopine dražijo sluznico, sprožijo kašelj in povzročijo izkašljevanje izmečka (16). Tak vzorec je vedén, zato jasno označimo, da gre za izzvani izmeček. Vsaj 1 ml tako pridobljene kužnine pošljemo v laboratorij v sterilni posodici z navojem v dveh urah pri ST ali v 24 urah pri 4 °C (5).
- Aspirat traheje pridobimo pri intubiranih bolnikih z aspiracijo vsebine spodnjih dihal. Preiskava je razmeroma preprosta, vendar je veljalo mnenje, da je v

primerjavi z bronhoskopsko pridobljenimi vzorci zaradi verjetne kontaminacije z izločki iz zgornjih dihal manjvredna v diagnostiki pljučnice, povezane z mehanskim predihavanjem, česar pa v različnih študijah niso potrdili (17). Smernice IDSA/ATS pri intubiranih bolnikih navajajo odvzem aspirata traheje (1, 7, 13). Najmanj 1 ml vzorca v sterilni posodici z navojem pošljemo v laboratorij v dveh urah pri ST, v primeru daljšega transporta pa v 24 urah pri 4 °C. Konica tubusa ni ustrezen vzorec za mikrobiološko diagnostiko pljučnice, povezane z mehanskim predihavanjem (1, 3, 6).

- Mini-BAL je slepa, nebronhoskopsko vodena preiskava, s katero pridobimo vzorec iz spodnjih dihal pri mehansko predihavanem bolniku. Z zaščitenim dvojnimi katetrom (teleskopski kateter) izkušeno zdravstveno osebje doseže spodnja dihalna, vbrizga majhno količino sterilne fiziološke raztopine, ki jo ponovno aspirira in shrani v sterilno posodico. Najmanj 1 ml vzorca prenesemo v laboratorij v dveh urah pri ST ali v 24 urah pri 4 °C (1, 3, 6).
- Antigenski testi iz seča: pri odraslih bolnikih z zmerno hudo ali hudo obliko ZBP ter pri hospitaliziranih bolnikih z ZBP se svetuje dokaz topnega pnevmokoknega antigena v seču. Občutljivost tega diagnostičnega pristopa je ocenjena na 57–86 %, specifičnost praviloma presega 96 %. Negativen rezultat tako ne izključuje pnevmokokne pljučnice (18, 19). Mikrobiološke preiskave za potrditev legioneloze so potrebne pri vseh bolnikih z zmerno hudo in hudo obliko pljučnice, ob dejavnih tveganja in v primeru izbruhov. Legionelozo lahko potrdimo z dokazom topnega antigena bakterije *L. pneumophila* serološke skupine 1 v seču, pri čemer se moramo zavedati možnosti negativnega rezultata zgodaj v poteku bolezni ali v primeru okužbe z *L.*

pneumophila iz drugih seroloških skupin. Zato v primeru utemeljenega suma na legionelozo in negativnega rezultata antigena v seču diagnostiko dopolnimo z dokazom legionele v vzorcih spodnjih dihal z metodo PCR, če je to mogoče, saj ti bolniki najpogosteje nimajo izmečka (20, 21). V sterilno posodico z navojem odvezamo najmanj 10 ml seča s prostim mokrenjem ter pošljemo v laboratorij v dveh urah pri ST ali v primeru daljšega transporta po navodilu proizvajalca v 24 urah do 14 dneh pri 4 °C ali pri -20 °C (3, 6).

Invazivno odvzete kužnine

- BAL: med bronhoskopiranjem se v spodnja dihalna vbrizga majhna količina fiziološke raztopine, ki se nato aspirira in shrani v sterilno posodico. Večji volumen kužnine v primerjavi z bronhoskopskim vzorcem z zaščitenim krtačenjem omogoča večjo občutljivost, pričakovana pa je manjša specifičnost, saj se vzorec pogosteje kontaminira z ustno mikrobioto. S kvantitativno obdelavo lahko izboljšamo specifičnost rezultata. Vzorec takoj prenesemo v laboratorij pri ST ali najkasneje v 48 urah pri 4 °C (7, 10, 22).
- Zaščiteno krtačenje: preiskavo praviloma izvaja izkušen bronhoskopist, ki s teleskopskim, na distalnem delu zaščitenim katetrom s krtačenjem dihalnih poti odvzame vzorec za preiskave. Tako odvzeta kužnina zagotavlja relativno dobro specifičnost, slabost preiskave je majhen volumen odvzete kužnine (0,001–0,01 ml), predvsem v primerjavi z BAL. Ob preiskavi se lahko poškodujejo bolnikova dihalna. Specifičnost preiskave povečamo s kvantifikacijo. Z rezultati študij niso mogli ne ovreči ne dokazati, da bi s tako pridobljenimi vzorci spodnjih dihal izboljšali klinični izid. Vzorec prenesemo v laboratorij v dveh urah pri ST ali najkasneje v 24 urah pri 4 °C (7, 10).

Kužnine, odvzete s primarno sterilnih mest

- Hemokulture so v pomoč v diagnostiki hude pljučnice, saj je preiskava visoko specifična, a je občutljivost nižja od 20 % (1–3, 5). Kri za hemokulturo odvezamo pred uvedbo antibiotičnega zdravljenja, 5–10 ml v aerobno in anaerobno stekleničko z gojiščem. Čim hitreje jih vstavimo v hemokulturni aparat, pri ST lahko počakajo do 4 ure (5, 6).
- Punktat plevralne tekočine: približno 40 % pljučnic spremlja plevralna efuzija, specifičnost kulture je zelo visoka, občutljivost pa nizka. V sterilno posodico prenesemo najmanj 2 ml punktata in takoj pošljemo v laboratorij. Če vzorec odvezamo zunaj delovnega časa laboratorija, 3–10 ml vzorca vbrizgamo v anaerobno hemokulturno stekleničko in shranimo pri ST (1–3, 5, 6) (Tabela 2).
- Košček pljučnega tkiva: shranimo v sterilni posodici z navojem, če je majhen, ga prelijemo z manjšo količino sterilne fiziološke raztopine. Vzorec takoj prenesemo v laboratorij, shranjevanje je možno do 48 ur v tioglikolatnem bujonu pri ST (1–3, 5, 6).

C. Pljučni absces

Absces iz spodnjih dihal sterilno punktiramo, najmanj 1 ml kužnine v brizgi, zaprti z zamaškom ali zaščitenim tulcem najpozneje v 15 minutah prenesemo v laboratorij. Punktat abscesa, vbrizgan v tioglikolatni bujon, pri ST lahko počaka do 48 ur (1–3, 5, 6).

D. Oslovski kašelj

Najprimernejši vzorec za mikrobiološko diagnostiko oslovskega kašlja je dokaz bakterijskih vrst *Bordetella pertussis* in *Bordetella parapertussis* v prvih dveh tednih po začetku bolezenskih znakov na sluznici dihal. Za neposredni dokaz povzročiteljev oslovskega kašlja z molekularno

Tabela 2: Odvzem in transport mikrobioloških vzorcev ob sumu na bakterijsko pljučnico.

Povzročitelj	Preiskava	Najprimernejša kužnina	Transport
Bakterije			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Razmaz po Gramu, aerobna kultura	Izmeček, bronhoskopsko odvzeti vzorci	SP, do 2 uri pri ST, do 24 ur pri 4 °C
	Dokaz topnega antigena v seču	Spontano mokrenje, najmanj 10 ml seča	SP, do 24 ur pri ST, 1–14 dni pri 4 °C ali –20 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	Razmaz po Gramu, aerobna kultura	Izmeček, bronhoskopsko odvzeti vzorci	SP, do 2 uri pri ST, do 24 ur pri 4 °C
<i>Haemophilus influenzae</i>	Razmaz po Gramu, aerobna kultura	Izmeček, bronhoskopsko odvzeti vzorci	SP, do 2 uri pri ST, do 24 ur pri 4 °C
<i>Enterobacteriales</i>	Razmaz po Gramu, aerobna kultura	Izmeček, bronhoskopsko odvzeti vzorci	Sterilna posodica, do 2 uri pri ST, do 24 ur pri 4 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Razmaz po Gramu, aerobna kultura	Izmeček, bronhoskopsko odvzeti vzorci	SP, do 2 uri pri ST, do 24 ur pri 4 °C
<i>Legionella</i> spp.	Dokaz topnega antigena v seču (<i>L. pneumophilla</i>) Kultura na BCYE	Spontano mokrenje, najmanj 10 ml seča	SP, do 24 ur pri ST, 1–14 dni pri 4 °C ali –20 °C
	PCR	Izzvan izmeček, bronhoskopsko odvzeti vzorci Izzvan izmeček, bronhoskopsko odvzeti vzorci	SP, do 2 uri pri ST, do 24 ur pri 4 °C SP, do 2 uri pri ST, do 24 ur pri 4 °C
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	PCR	Bris žrela, bris NF, izmeček, BAL	Transport v M4-gojišču ali drugem ustreznem gojišču pri ST ali pri 4 °C do 48 ur ; ≥48 ur pri –70 °C
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	PCR	Bris NF, izpirek žrela, izmeček, bronhoskopsko odvzeti vzorci	Transport v M4-gojišču ali drugem ustreznem gojišču pri ST ali 4 °C do 48 ur ; ≥48 ur pri –70 °C
Mešana anaerobna mikrobiota (aspiracijska pljučnica)	Razmaz po Gramu, aerobna in anaerobna kultura	Zaščiteno krtačenje Plevralni punktati	SP z 1 ml tioglikolata ali sterilne fiziološke raztopine, do 2 uri pri ST SP, do 60 minut pri ST Transportno gojišče za anaerobe, do 72 ur pri ST
Kratice: SP – sterilna posodica, ST – sobna temperatura, BCYE – gojišče s cisteinom L in železovimi solmi, angl. <i>buffered charcoal yeast extract</i>			

preiskavo (PCR) odvezamo aspirat nosno-žrelnega prostora ali nosni del žrela obrišemo z dakronskim brisom. Za kultivacijo *B. pertussis/parapertussis* bris nosnega dela žrela vstavimo v transportno gojišče Regan-Lowe oz. odvezamo aspirat nosnega dela žrela, ki ga shranimo v sterilni posodici. Kužnine prenesemo v laboratorij v dveh urah pri ST ali najkasneje v 24

urah pri ST (8). Novejši pristop je uporaba patentiranega najlonskega krtačnega brisa v 1 ml tekočega gojišča Amies (Copan ESwab®), ki je primerno za kultivacijo in PCR (6, 9). Po odvzemu kužnine je treba bris pustiti v gojišču. Krtačni bris v tekočem gojišču Amies prenesemo v laboratorij v dveh urah pri ST ali najkasneje v 24–48 urah pri 4 °C (3, 5–7) (Tabela 1).

E. Cistična fibroza

Pri bolnikih s cistično fibrozo lahko zaradi kroničnega vnetja dihal poslabšanje bolezenskega stanja povzroča širok nabor mikroorganizmov. Pri mlajših bolnikih najpogosteje izoliramo *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, pri nekoliko starejših otrocih postanejo pomembni patogeni po Gramu negativni nefermentativni bacili (*P. aeruginosa*, ki zaradi oksidativnega stresa porašča v obliki biofilma), *S. maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, bakterije iz kompleksa *Burkholderia cepacia*, glive in plesni. Možne so tudi okužbe z netuberkuloznimi mikobakterijami, npr. vrste iz kompleksa *Mycobacterium abscessus* in *Mycobacterium avium*. Najprimernejši vzorec je izmeček, pri bolnikih, ki izmečka nimajo, lahko na mikrobiološko preiskavo pošljemo izpirek ustnega žrela ali nosnega dela žrela, BAL, nakašljan bris ali izzvan izmeček (23, 24). Kužnine za kultivacijo bakterij in gliv prenesemo v sterilni posodici v laboratorij v dveh urah pri ST ali najkasneje 24 urah pri 4 °C. Kužnine za dokaz virusov pošljemo v laboratorij v transportnem gojišču za viruse (bris) ali v sterilni embalaži v dveh urah pri ST ali najkasneje v 24 urah pri 4 °C (3).

F. Pljučna tuberkuloza

Bakterije iz kompleksa *Mycobacterium tuberculosis* pri osebah z vztrajajočim produktivnim kašljem iščemo v izmečku, še zlasti če ga spremlja oslabelost, izguba teže, nočno potenje ali tveganje za tuberkulozo (2). Za identifikacijo povzročitelja pridobimo tri vzorce 5–10 ml jutranjega izmečka, oddanega ob različnih dnevih. Če bolnik izmečka nima, pridobimo izzvan izmeček. Predvsem pri otrocih lahko pridobimo kužnino tudi z jutranjo lavažo želodca, ki jo izvedemo pred jutranjim zaužitjem hrane ali zdravila oz. najmanj 8 ur po zadnjem zaužitju. Pridobimo 5–10 ml vzorca, ki ga nevtraliziramo v 100 mg na-

trijevega karbonata (3, 5). Kužnine v laboratorij pošljemo v sterilni posodici v 2 urah pri ST ali v 24 urah pri 4 °C (3). Transport kužnin v laboratorij ne sme biti daljši od 24 ur (5).

G. Pljučnica pri bolnikih z imunsko pomanjkljivostjo

Bolnike s prirojeno ali pridobljeno imunsko pomanjkljivostjo ogrožajo vsi običajni patogeni, ki povzročajo okužbe dihal, še zlasti pozorni pa moramo biti tudi na glive, viruse in parazite. Pri bolnikih z imunsko pomanjkljivostjo, ki navajajo težko dihanje in vročino, iščemo tudi glivo *Pneumocystis jirovecii*, ki povzroča pnevmocistično pljučnico (PCP). Gliva je pogosto prisotna tudi v pljučih zdravih oseb in ne povzroča bolezenskih znakov. Za diagnostiko PCP pridobimo bronhoskopske vzorce (BAL, izpirek bronha, odvzem z zaščitenim krtačenjem), spontan ali izzvan izmeček (3). Vzorce za molekularni dokaz *P. jirovecii* pošljemo v laboratorij v dveh urah pri ST ali v največ 24 urah pri 4 °C, za dokaz antigena *P. jirovecii* v kužnini je dovoljen podaljšan transport do 4 ure pri 4 °C (6).

ZAKLJUČEK

Kljub vse bolj naprednim tehnikam v naboru mikrobioloških preiskav sta osnovna pogoja za kakovosten izvid odvzema ustreznega vzorca v ustreznih okoliščinah ter primerno shranjevanje in transport vzorca. Področje zgornjih dihal je bogato z normalno mikrobioto, kar omejuje natančnost in oteži interpretacijo rezultatov mikrobiološke diagnostike okužb spodnjih dihal. Predolg transport, predhodno antibiotično zdravljenje ali neustrezno izbrana preiskava lahko vplivajo na rezultat. Zato je pri interpretaciji rezultatov potrebna kritična presoja, za kar je potrebno dobro sodelovanje ter izmenjava informacij med lečečim zdravnikom in kliničnim mikrobiologom (3).

LITERATURA

- Loens K, Van Heirstraeten L, Malhotra-Kumar S, Goossens H, Ieven M. Optimal sampling sites and methods for detection of pathogens possibly causing community-acquired lower respiratory tract infections. *J Clin Microbiol.* 2009;47(1): 21–31.
- Seme K, Pečavar B, Petrovec M. Mikrobiološka diagnostika okužb dihal = Microbiological diagnosis of respiratory tract infection. V: Beovič, Bojana (ur.), Lejko-Zupanc, Tatjana (ur.), Tomažič, Janez (ur.). *Stopenjska diagnostika in zdravljenje pogostih okužb*. Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje SZD, 2017; 53–61.
- Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, Gonzalez MD, Jerris RC, Kehl SC, Patel R, Pritt BS, Richter SS, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Snyder JW, Telford S 3rd, Theel ES, Thomson RB Jr, Weinstein MP, Yao JD. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis.* 2018;67(6): 813–816.
- Gonzales R, Bartlett JG, Besser RE, Cooper RJ, Hickner JM, Hoffman JR, Sande MA; Centers for Disease Control and Prevention. Principles of appropriate antibiotic use for treatment of uncomplicated acute bronchitis: background. *Ann Emerg Med.* 2001;37(6): 720–7.
- Klinika Golnik. Respiratorni laboratorij [cited 2022 Jun 20]. Available from: [www.klinika-golnik.si/storage/_sites/golnik/app\(media/laboratorij-za-respiratorno-mikrobiologijo/Navodila-za-ustrezen-odvzem-in-transport-kuznin-za-bakteriološko-preiskavo-pdf](http://www.klinika-golnik.si/storage/_sites/golnik/app(media/laboratorij-za-respiratorno-mikrobiologijo/Navodila-za-ustrezen-odvzem-in-transport-kuznin-za-bakteriološko-preiskavo-pdf).
- Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo MF UL: Odvzem in transport vzorcev [cited 2022 Jun 20]. Available from: <https://imi.si/en/odvzem-in-transport-vzorcev/>.
- Carroll KC. Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections: controversy and conundrums. *J Clin Microbiol.* 2002;40(9): 3115–20.
- Keše D, Ihan A, Bordetele. V: Ihan A, Müller Premru M, Seme K, Matos T. Medicinska bakteriologija z mikologijo in parazitologijo. Ljubljana. Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo; 2020; 208–11.
- Van Horn KG, Audette CD, Sebeck D, Tucker KA. Comparison of the Copan ESwab system with two Amies agar swab transport systems for maintenance of microorganism viability. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(5): 1655–8.
- Heyland D, Ewig S, Torres A. Pro/con clinical debate: the use of a protected specimen brush in the diagnosis of ventilator associated pneumonia. *Crit Care.* 2002; 6(2): 117–20.
- Musher DM, Thorner AR. Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med.* 2014; 371: 1619.
- Torres A, Cilloniz C, Niederman MS, Menéndez R, Chalmers JD, Wunderink RG, et al. Pneumonia. *Nat Rev Dis Primers.* 2021; 7(1): 25.
- Gadsby NJ, Russell CD, McHugh MP, Mark H, Conway Morris A, Laurenson IF, Hill AT, Templeton KE. Comprehensive molecular testing for respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2016; 62(7): 817–823.
- Metlay, Joshua P, et al. "Diagnosis and treatment of adults with community-acquired pneumonia. An official clinical practice guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America." *American journal of respiratory and critical care medicine* vol. 2019: e45–e67.
- Avčini S, Jezernik M. Ocena tipa in aktivnosti vnetja pri bolnikih z obstruktivno pljučno boleznijo. *Med Razgled* 2005; 44: 425–433.
- Žibert U. Optimizacija izbranih dejavnikov predanalizne in analizne faze pri mikroskopskem pregledu inducirane izmečka, 2022. Magistrsko delo, Fakulteta za farmacijo UL [cited 2022 Jun 20]. Available from: <https://repositorij.uni-lj.si/lzpisGradiva.php?lang=slv&id=135677>.
- Kalantar KL, Moazed F, Christenson SC, Wilson J, Deiss T, Belzer A, Vessel K, et al. Metagenomic comparison of tracheal aspirate and mini-bronchial alveolar lavage for assessment of respiratory microbiota. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2019; 316(3): L578–L584.
- Peghin M, Bouza E. Community-acquired pneumonia: is less more? *Lancet Infect Dis.* 2022; 22(2): 159–61.
- Molinos L, Zalacain R, Menéndez R, Reyes S, Capelastegui A, Cillóniz C, et al. Sensitivity, specificity, and positivity predictors of the pneumococcal urinary antigen test in community-acquired pneumonia. *Ann Am Thorac Soc.* 2015; 12(10): 1482–9.
- Viasus D, Calatayud L, McBrown MV, Ardany C, Carratalà J. Urinary antigen testing in community-acquired pneumonia in adults: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019; 7(2): 107–115.
- Burillo A, Pedro-Botet ML, Bouza E. Micro-

- biology and epidemiology of Legionnaire's disease. *Infect Dis Clin North Am.* 2017; 31(1): 7–27.
22. Lück PC, Steinert M. Pathogenesis, diagnosis and therapy of Legionella infections. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2006; 49(5): 439–49.
 23. Sanchez Nieto JM, Carillo Alcaraz A. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of bacterial pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995; 14(10): 839–50.
 24. Seme K, Tomič V. Mikrobiološka diagnostika bakterijskih okužb dihal. *Med Razgl.* 2016; 55Suppl.4: 65–71.
 25. Eyns H, Piérard D, De Wachter E, Eeckhout L, Vaes P, Malfroot A. Respiratory bacterial culture sampling in expectorating and non-expectorating patients with cystic fibrosis. *Front Pediatr.* 2018; 6: 403.

Urška Glinšek Biškup,¹ Barbara Šoba Šparl¹

Posebnosti odvzema in transporta vzorcev za parazitološke preiskave

Exceptions to the collection and transport of specimens for the detection of parasites

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: paraziti, parazitoze, vzorci, odvzem, prenos

V prispevku so opisane posebnosti pri odvzemu in prenosu vzorcev za parazitološke preiskave. Laboratorijska diagnostika parazitov zajema mikroskopski, lahko tudi makroskopski pregled vzorcev, kultivacijo, dokaz antigenov parazita, molekularne in serološke preiskave. Glede na vrsto preiskave se odvzem in pogoji prenosa pri posameznem vzorcu lahko razlikujejo. V pomoč pri izbiri vzorca, odvzemu in pogojih transporta so navodila na spletni strani Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Pogoj za uspešno diagnostiko parazitov okužb je dobra komunikacija kliničnega zdravnika s parazitološkim laboratorijem.

ABSTRACT

KEY WORDS: parasites, parasitoses, samples, sampling, transport

This article describes exceptions to the collection and transport of specimens for the detection of parasites in patients with suspected parasitic disease. Laboratory diagnosis of parasites is made by microscopy, sometimes also by macroscopic examination, culturing, antigen detection, molecular and serological tests. Sample collection and transport may differ depending on the detection method used. The information and advice on choosing the right sample, sampling method and transport conditions is available on the website of the Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana. Good communication between clinician and laboratory is crucial for successful parasite diagnostics.

UVOD

Pri naročilu parazitološke preiskave je treba upoštevati, da bodo rezultati odvisni tudi od ustreznega odvzema in prenosa

vzorcev v laboratorij. Zavedati se moramo, da prisotne okužbe morda ne bomo potrdili, če vzorec ni pravilno odvzet in prenesen. Pomembni podatki za usmeritev la-

¹ Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana. Korespondenca/correspondence: urska.glinsek@mf.uni-lj.si, barbara.soba@mf.uni-lj.si

boratorijske diagnostike v parazitološkem laboratoriju so poleg osnovnih podatkov (klinični znaki in simptomi, morebitna terapija idr.) tudi bolnikovo imunsko stanje ter zgodovina potovanja in bivanja, zato spodbujamo dosledno navajanje teh podatkov.

Material odvezamemo v natančno označeno, čisto embalažo z zamaškom, ki dobro tesni, da vsebina ne izteče oziroma se ne izsuši. Z vsakim materialom delamo previdno, saj je prav vsak lahko vir okužbe, večina kužnin pa je tudi neponovljivih (1). Napotki za odvzem in transport vzorcev za parazitološke preiskave v Laboratoriju za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani so dostopni na naši spletni strani (<https://imi.si/katalog-preiskav/>). V primeru nejasnosti oz. posebnosti glede odvzema in prenosa kužnine je najboljši posvet s parazitološkim laboratorijem. Za nekatere kužnine in preiskave je treba o naročilu preiskave predhodno obvestiti laboratorij, da se ta ustrezno pripravi (predvsem priprava ustreznih gojišč), ob tem pa lahko naročniku tudi svetujemo glede pravilnega odvzema in transporta.

POSEBNOSTI PRI ODVZEMU IN PRENOSU VZORCEV

Blato

Patogeni paraziti, ki jih najdemo v blatu človeka, sodijo med praživali in helminte. Za preiskavo na parazitsko okužbo se blato bolniku odvzame pred zdravljenjem v za to namenjene posodice z žličko in z zamaški, ki dobro tesnijo in s tem preprečijo iztekanje in izsušitev odvetega materiala (1). Priporočamo, da se napolnjene posodice zaradi varnosti vstavijo v zaščitno plastično vrečko. Blata nikoli ne zamrzujemo ali segrevamo na 37 °C. Za preiskavo so potrebni najmanj trije vzorci blata po dva do pet gramov, odvzeti v različnih

dneh, najbolje vsak drugi dan. Ciste in jajčeca parazitov se v blatu namreč ne izločajo stalno, zato z večkratnim odvzemom blata v različnih dneh povečamo občutljivost preiskave. S pregledom enega samega vzorca blata dosežemo le 40–50-odstotno občutljivost. Če obstaja sum, da ima bolnik črevesno amebozo, se celo priporoča odvzem šestih vzorcev blata v šestih različnih dneh znotraj 14-dnevnega intervala, s čimer preiskava blata na *Entamoeba histolytica* doseže občutljivost 90 % (1, 2). Blato bolnika se pregleda tudi po zaključenem zdravljenju. Pri okužbi s praživalmi se trije vzorci blata pregledajo tri do štiri tedne po zdravljenju, pri okužbi s helminti pa pet do šest tednov po zaključku zdravljenja (1).

Če ima bolnik drisko in je blato tekoče, je od parazitskih okužb najbolj verjetna okužba s praživalmi. Ob hudih driskah so te lahko v blatu prisotne le v obliki trofozoitov, ki zunaj gostitelja hitro propadejo. Zato je pomembno, da mikroskopski pregled izvedemo čim prej, najkasneje v 30 minutah po odvzemu. V tem primeru blato do pregleda hranimo na sobni temperaturi. Če transport vzorcev v parazitološki laboratorij v tem času ni mogoč, odvezamemo blato v posodice, ki so polnjene s konzervansom. Ta konzervira parazite v blatu (omogoči ohranitev njihove morfologije, prepreči nadaljnji razvoj jajčec in ličink helmintov) in hkrati zaščiti mikrobiologa pred morebitno okužbo. Blato lahko v posodici s konzervansom hranimo pri 2–8 °C ali na sobni temperaturi še 1–2 dni po zadnji napolnjeni posodici (1).

Pri bolnikih brez driske, pri katerih zaradi drugih znakov/simptomov sumimo na črevesno parazitozo, je bolj verjetna okužba s helminti. Jajčeca helmintov so izredno odporna, zato lahko formirano blato odvezamemo tudi v posodico brez konzervansa in hranimo pri 2–8 °C do 24 ur po odvzemu. Če transport vzorcev formiranega blata v

parazitološki laboratorij v tem času ni mogoč, odvezamo blato v posodice s konzervansom in jih nato hranimo od 1 do 2 dni pri 2–8 °C ali na sobni temperaturi (1).

Za molekularno diagnostiko blato hranimo do 24 ur pri 2–8 °C in ga odvezamo v posodico brez konzervansa. Nekateri konzervansi namreč lahko povzročijo fragmentacijo ali poškodujejo DNK parazita, zaradi česar so možni lažno negativni rezultati molekularne preiskave (1).

Naročnikom preiskav blata na parazite v Laboratoriju za parazitologijo IMI je na voljo komplet treh posodic za odvzem in prenos vzorcev blata (Slika 1). Prvi dve posodici sta polnjeni s konzervansom, tretja pa je prazna in je namenjena kultivaciji parazitov iz blata in morebitnim molekularnobiološkim preiskavam. Bolnik oz. zdravstveni delavec odvzame blato v posodice v treh različnih dneh, najbolje po en vzorec vsak drugi dan, po navodilih, ki so priložena kompletu. Pomembno je, da se v posodice s konzervansom blato polni do oznake, ker le ustrezna polnitev zagotovi pravilno razmerje med vzorcem in konzervansom (3). Ob napolnitvi vseh treh posodic, pri čemer je zadnji vzorec odvzet v posodico brez konzervansa, se ustrezno označen komplet pošlje v laboratorij skupaj z izpolnjenim spremnim listom (2).

Ob sumu na okužbo z glisto *Enterobius vermicularis* (podančica) je občutljivost preiskave veliko večja, če namesto blata bolniku odvezamo perianalni odtis. Jajčeca *E. vermicularis* namreč najdemo v blatu le pri 5 % okuženih ljudi (2). Perianalni odtis odvezamo bolniku zjutraj, preden gre na stranišče in preden se umije, saj samice parazita ponoči odlagajo jajčeca na perianalne gube. Pomembno je, da za odvzem odtisa uporabimo prozoren lepilni trak, ki ga po odtisu prilepimo na objektno stekelce (1). Odtis lahko hranimo na sobni temperaturi in ga v laboratorij pošljemo v ustrezni zaščitni embalaži. Okužbo lahko izključimo šele



Slika 1: Komplet treh posodic za odvzem in prenos blata na parazitološko preiskavo, ki je na voljo naročnikom preiskav Laboratorija za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Prvi dve posodici sta polnjeni s konzervansom, vanju se odvzame prva dva vzorca blata, tretja posodica, v katero se shrani zadnji vzorec, pa je prazna in namenjena kultivaciji parazitov iz blata in molekularnobiološkim preiskavam.

po pregledu štirih do šestih negativnih odtisov, odvzetih v različnih dneh (1).

Ob sumu na okužbo z glisto *Strongyloides stercoralis* je priporočljiv odvzem več zaporednih vzorcev blata, prav tako v različnih dneh. Pri mikroskopskem pregledu enega vzorca je občutljivost 30-odstotna, medtem ko se pri pregledu sedmih vzorcev blata, odvzetih v različnih dneh, občutljivost poveča na skoraj 100 %. To še zlasti velja za bolnike s kronično okužbo, pri katerih je parazitacija običajno nizka (1, 4). Blato bolnika s sumom na okužbo s *S. stercoralis* lahko tudi kultiviramo, s čimer povečamo občutljivost preiskave. Blato za kultivacijo je v laboratorij treba poslati čim bolj sveže, v posodici brez konzervansa, da ostanejo ličinke parazita, če so v blatu prisotne, do transporta v laboratorij še žive. Vzorce blata pred prenosom lahko hranimo od 15 minut do 4

ure, obvezno na sobni temperaturi in nikakor ne v hladilniku (1). V laboratoriju blato odložimo na posebno gojišče, zato je laboratorij treba vnaprej obvestiti o odvzemu, da to gojišče pravočasno pripravi. Gojišče z nacepljenim blatom se pregleduje do 6 dni. Odsotnost ličink po kultivaciji sicer ne izključuje okužbe, je pa pri negativnih rezultatih verjetnost okužbe majhna. Poleg blata je primerna kužnina pri sumu na strongiloidozo tudi sok dvanajstnika. Respiratorni vzorci in likvor so primerna kužnina pri sumu na hiperinfekcijski sindrom in diseminirano okužbo (1, 4, 5). V Laboratoriju za parazitologijo IMI nudimo tudi molekularnobiološko diagnostiko strongiloidoze. Zanj vzorcu ne sme biti dodan konzervans, pred prenosom v laboratorij ga lahko hranimo do 24 ur pri 2–8 °C.

Urogenitalni vzorci

Trichomonas vaginalis dokazujemo z molekularnimi metodami, mikroskopskim pregledom, lahko ga tudi gojimo v primernem tekočem gojišču. Pri sumu na okužbo s praživaljo *T. vaginalis* je najprimernejša kužnina bris nožnice ali sečnice, ki ga vstavimo v epruveto z ustreznim transportnim gojiščem (6). Naročnikom preiskave Laboratorija za parazitologijo IMI je na voljo transportno gojišče CAT broth™ (Slika 2) proizvajalca Copan (Italija). Poleg naštetih so sprejemljive kužnine tudi prvi curek urina in izcedek iz prostate, nožnice ali sečnice ter ejakulat, ki jih odvajamo v sterilno plastično posodico z navojem (6). Če želimo mikroskopski pregled kužnine, ga je treba v laboratoriju opraviti v 30 minutah po odvzemu. Kužnino do transporta hranimo na sobni temperaturi. Če prenos vzorcev v parazitološki laboratorij v tem času ni mogoč, jih hranimo pri 37 °C do največ 4 ure. Za molekularno diagnostiko se lahko čas do transporta v laboratorij podaljša na 24 ur, vzorec lahko do takrat hranimo tudi pri 2–8 °C (1).



Slika 2: Transportno gojišče CAT broth™ (Copan, Italija) za *Trichomonas vaginalis*.

Urinaro shistosomozo, ki jo povzroča metljaj *Schistosoma haematobium*, lahko potrdimo z dokazom jajčec v urinu (7). Največ jajčec se v urinu izloča med poldnevom in tretjo uro popoldan, zato ga je najprimernejše odvzeti v tem delu dneva. Lahko se zbira tudi celodnevni urin. Za mikroskopsko preiskavo ga odvajamo v sterilno posodico z navojem, pred prenosom v laboratorij ga lahko hranimo do 24 ur pri 2–8 °C (1).

Vzorci iz očesa

Pri sumu na okužbo očesa z amebami iz rodu *Acanthamoeba* je najprimernejša kužnina postržek roženice, sprejemljive kužnine pa so še kontaktna leča, bris roženice in prekatna vodka (1). V Laboratoriju za parazitologijo IMI je bila do nedavnega osnovna diagnostična metoda za diagnostiko akantamebnega keratitisa kultura kužnine na ustreznem gojišču. Za kultivacijo naročnik preiskave kužnino takoj po odvzemu odloži na gojišče Page z nacepljeno enterobakterijo, običajno je to *Escherichia coli*. Gojišče pripravimo na IMI, in sicer po predhodnem naročilu. Naročnik preiskave mora gojišče nujno naročiti vsaj en dan pred načrtovanim odvzgom kužnine. Nacepljeno gojišče lahko

hranimo do 15 minut na sobni temperaturi. Če transport v parazitološki laboratorij v predvidenem času ni mogoč, ga hranimo do 4 ure pri 37 °C (1). Aprila 2022 smo v Laboratoriju za parazitologijo IMI diagnostiko akantamebnega keratitisa dopolnili z molekularnobiološko preiskavo, ki je bolj občutljiva od detekcije akantameb s klasičnimi preiskavami, dodatna prednost pa je tudi hitrejši dokaz povzročitelja. Zaradi navedenih prednosti molekularno diagnostiko ob sumu na akantamebni keratitis močno spodbujamo. Za to preiskavo naročnik kužnino odloži v epruveto s sterilno fiziološko raztopino.

Druge posebnosti

Lišmaniozo neposredno dokazujemo s klasičnimi parazitološkimi metodami (mikroskopija, kultivacija) in molekularnimi metodami. Pri sumu na kožno lišmaniozo je najprimernejša kužnina biopt z roba kožne spremembe. Najbolje je odvzeti več bioptov s »punch« biopsijo, sprejemljivi kužnini sta še aspirat ali postržek kožne spremembe (1). Rano je pred odvzecom treba očistiti s 70-odstotnim alkoholom. Biopt odložimo v sterilno posodico z navojem, vzorcu dodamo nekaj kapljic sterilne fiziološke raztopine, da se ne izsuši, ali pa ga odložimo na sterilno gazo, navlaženo s sterilno fiziološko raztopino (1). Kri pri sumu na kožno lišmaniozo ni primeren vzorec, prav tako niso primerne posredne serološke preiskave. Pri sumu na visceralno lišmaniozo odvezamemo vsaj 1 ml sterilnega punktata kostnega mozga, jeter, vranice, bezgavk in pogojno tudi kri. Odvezamemo jih v sterilno posodico z navojem ali epruveto (1). Vzorce lahko hranimo do 4 ure na sobni temperaturi, če transport vzorcev v parazitološki laboratorij v tem času ni mogoč, jih lahko hranimo pri 2–8 °C do največ 24 ur (1), kar seveda ne velja za kultivacijo.

Malarija je nujno stanje, ki zahteva takojšnjo postavitev diagnoze in ustrezno

zdravljenje. Laboratorijska diagnostika malarije mora zato biti hitra in zanesljiva. Hitri testi omogočajo prvo orientacijsko diagnostiko malarije že ob bolniku, dokončno in natančnejšo diagnozo pa dobimo z mikroskopskim pregledom obarvane goste kaplje krvi in krvnega razmaza v laboratoriju, kar je v diagnostiki malarije še vedno zlati standard (8). Pri morebitnih nejasnostih ob postavljanju diagnoze so nam lahko v pomoč molekularni testi (7, 9). Pri sumu na malarijo je za mikroskopski pregled primerna kužnina razmaz periferne krvi na označenem objektnem stekelcu (1). Primeren vzorec tako za mikroskopski pregled kot tudi za molekularne preiskave in hitri antigenski test je še polna kri z dodatkom EDTA. Odvzeti je potrebno vsaj 1 ml krvi, najbolje ob napadu mrzlice. Vzorce lahko hranimo na sobni temperaturi do 15 minut, če prenos vzorcev v parazitološki laboratorij v tem času ni mogoč, jih hranimo pri 2–8 °C do največ 4 ure. Hiter prenos vzorcev krvi je pomemben predvsem pri mikroskopskem pregledu, saj se ob dolgotrajnem hranjenju/transportu vzorca eritrociti in tudi morfološka malarijskih parazitov toliko spremenijo, da zanesljiva določitev vrste plazmodija, ki je povzročil malarijo, ni več vedno mogoča (1, 8).

ZAKLJUČEK

Mikrobiološke preiskave na parazitske okužbe človeka so izredno raznolike, zato je pri odvzemu in prenosu kužnin precej posebnosti. V prispevku so predstavljene najpomembnejše. Zavedati se moramo, da ob sumu na parazitsko okužbo prebavil odvezem več (vsaj treh) vzorcev blata v različnih dneh močno poveča občutljivost diagnostike in je zato zelo priporočljiv, preden okužbo dokončno izključimo. Če sumimo na okužbo s praživalmi prebavil, mora biti blato v laboratorij prineseno hitro, najpozneje v 30 minutah, če to ni mogoče, pa ga odvezamemo v poso-

dice, ki so polnjene s konzervansom. Če je vzorec namenjen za kultivacijo, mora biti svež in brez dodanega konzervansa, prenos v laboratorij pa hiter in napovedan. Za uspešno diagnostiko parazitskih okužb je ključna dobra komunikacija kliničnega zdravnika s parazitološkim laboratorijem. Povzetek posebnosti pri odvzemu in prenosu vzorcev je predstavljen v Tabeli 1.

LITERATURA

1. Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 6th ed. Washington: ASM Press; 2016.
2. Šoba B. Laboratorijska diagnostika parazitov v blatu. In: Kotar T, Lejko Zupanc T, eds. Po-tovalna medicina: Med Razgl. 2013;52(suppl 5):129–33.
3. Amin OM. Evaluation of a new system for the fixation, concentration, and staining of intestinal parasites in fecal specimens, with critical observations on the trichrome stain. J Microbiol Methods. 2000;39(2):127–32.

Tabela 1: Povzetek posebnosti odvzema in prenosa vzorcev za parazitološke preiskave.

Kužnina/Vzorec	Preiskava	Embalaža
tekoče blato	Praživali (in helminti) prebavil Mikroskopski pregled	Plastična posodica z žličko in zamaškom z navojem
	Molekularna diagnostika	
Formirano blato	Helminti (in praživali) prebavil Mikroskopski pregled	Plastična posodica z žličko in zamaškom z navojem
	Molekularna diagnostika	
Perianalni odtis	<i>Enterobius vermicularis</i> Mikroskopski pregled	Prozoren lepilni trak nalepimo na objektno stekelce in pošljemo v ustrezni zaščitni embalaži
Blato (opomba: obvestiti laboratorij)	<i>Strongyloides stercoralis</i> Kultivacija	Plastična posodica z žličko in zamaškom z navojem
	Molekularna diagnostika	
Vaginalni bris, bris uretre, urin – prvi curek, izcedek, ejakulat	<i>Trichomonas vaginalis</i> Mikroskopski pregled	Epruveta s transportnim gojiščem (CAT broth™)/ Sterilna posodica z navojem
	Molekularna diagnostika	
Urin	<i>Schistosoma haematobium</i> Mikroskopski pregled	Sterilna posodica z navojem
Postržek roženice, kontaktna leča, bris roženice, prekatna vodka (opomba: obvestiti laboratorij vsaj 1 dan pred odvzemom)	<i>Acanthamoeba</i> spp. Kultivacija	Kužnino takoj po odvzemu cepimo na gojišče Page z <i>E. coli</i>
	Molekularna diagnostika	Kužnino odložimo v epruveto s sterilno fiziološko raztopino
Biopt, aspirat, postržek kožne spremembe	Kožna lišmanioza Mikroskopski pregled	Sterilna posodica z navojem ali epruveta, navlažimo
	Molekularna diagnostika	
Punktat kostnega mozga, jeter, vranice, bezgavk, pogojno kri	Visceralna lišmanioza Mikroskopski pregled	Sterilna posodica z navojem ali epruveta
	Molekularna diagnostika	
Periferna kri	Malaria Mikroskopski pregled	Razmaz na objektnem stekelcu
Venska kri	Malaria Mikroskopski pregled	Epruveta z EDTA
	Molekularna diagnostika	

Legenda: ST – sobna temperatura

4. Krolewiecki A, Nutman TB. Strongyloidiasis: A Neglected Tropical Disease. *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(1):135–51.
5. Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of Strongyloides stercoralis infection. *Clin Infect Dis.* 2001;33(7):1040–7.
6. Skvarč M, Matičič M, Šoba B. Trichomonas vaginalis: zapostavljen povzročitelj spolno prenosljivih bolezní? *In: Petrovec M, Golle A, eds. 6 Baničevi dnevi: Okužbe spolovil in spolno prenosljive bolezní: Med Razgl.* 2014;53(suppl 6):99–108.
7. Schwartz E. *Tropical Diseases in Travelers.* 1st ed. Hoboken (NJ): Blackwell Publishing; 2009. p. 187–228.
8. Šoba B, Kotar T, Biasizzo H, et al. Laboratorijska diagnostika malarije. *In: Kotar T, Lejko Zupanc T, eds. Potovalna medicina: Med Razgl.* 2013;52(suppl 5):135–41.
9. CDC: Malaria diagnosis and treatment in the United States [internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2019 [cited 2021 Aug 19]. Available from: https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/index.html.

	Količina vzorca/Čas odvzema	Lokalni prenos	Daljši prenos
	2–5 g ali do 1/3 posodice/ Za mikroskopski pregled najmanj 3 vzorci v različnih dneh. Pred zdravljenjem oz. 3–4 tedne po njem.	≤ 30 min sobna temperatura brez konzervansa	≤ 2 dni 2–8 °C/ST s konzervansom
		E 24 h 2–8 °C, brez konzervansa	
	2–5 g ali do 1/3 posodice/Za mikroskopski pregled najmanj 3 vzorci v različnih dneh. Pred zdravljenjem oz. 5–6 tednov po njem.	≤ 24 h 2–8 °C brez konzervansa	≤ 2 dni 2–8 °C/ST s konzervansom
		≤ 24 h 2–8 °C, brez konzervansa	
	Zjutraj pred umivanjem, 4–6 vzorcev v različnih dneh	ST	
	2–5 g ali do 1/3 posodice/ Za mikroskopski pregled 7 vzorcev v različnih dneh	≤ 15 min sobna temperatura, brez konzervansa	≤ 4 h 37 °C, brez konzervansa
		≤ 24 h 2–8 °C, brez konzervansa	
		≤ 30 min ST	≤ 4 h 37 °C
		≤ 24 h 2–8 °C	
	Med 12:00 in 15:00 ali celodnevni urin	≤ 24 h 2–8 °C	
		≤ 15 min ST	≤ 4 h 37 °C
	Več bioptov z roba kožne spremembe	≤ 4 h ST	≤ 24 h 2–8 °C
	Vsaj 1 ml	≤ 4 h ST	≤ 24 h 2–8 °C
	Tanek krvni razmaz in debela kaplja krvi/ Odvzem ob napadu mrzlice	Posušen razmaz lahko hranimo na ST do prenosa	
	Vsaj 1 ml	≤ 15 min ST	≤ 4 h 2–8 °C
		≤ 24 h 2–8 °C	

Urška Kramar,¹ Helena Ribič²

Odvzem in transport vzorcev urina za mikrobiološke preiskave

Urine sample collection and transport for microbiological examination

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: okužbe sečil, urinokultura, odvzem vzorcev urina

Okužbe sečil so, takoj za okužbami dihal, med najpogostejšimi okužbami tako v domačem kot v bolnišničnem okolju in eden od najpogostejših vzrokov za predpisovanje antibiotičnega zdravljenja. Pri odraslih je ocenjena letna incidenca okužb sečil 2–3 %. Z vidika javnega zdravja je med drugim skrb vzbujajoče naraščanje odpornosti bakterije *Escherichia coli* pa tudi drugih povzročiteljev proti večini protimikrobnih zdravil. Zlati standard mikrobiološke preiskave urinov še naprej ostaja urinokultura. Najprimernejši vzorec ob sumu na okužbo sečil je vzorec srednjega curka prvega jutranjega urina. Večina vzorcev je odvzetih neinvazivno, a se zaradi spreminjanja strukture prebivalstva počasi, a vztrajno povečuje tudi delež drugih načinov odvzema. Ob dejstvu, da se tudi občutljivost mikroorganizmov za protimikrobna zdravila nenehno spreminja in da narašča delež odpornih bakterij, narašča tudi potreba po mikrobiološki analizi povzročiteljev okužb in določanju občutljivosti za antibiotike.

ABSTRACT

KEY WORDS: urinary tract infection, urine culture, urine samples

Urinary tract infections are immediately after respiratory infections among the most common infections and are one of the most common reasons for prescribing antibiotic therapy. Among adults the estimated annual incidence is 2–3%. From the perspective of public health we notice a significant rise in the resistance of *Escherichia coli* as well as other agents. Urine culture continues to be the golden standard of microbiological processing of urine. On suspicion of an urinary tract infection, the most appropriate sample is taken from the midstream of the first morning urine. Most urine samples are obtained with non-invasive methods, however with the changes in population structure, other urine sample collection methods are slowly and steadily on the rise. Due to the fact that the susceptibility of microorganisms is constantly changing and the proportion of resistant bacteria is growing, the need for microbiological analysis of infectious agents and antimicrobial susceptibility testing is increasing.

¹ Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Center za medicinsko mikrobiologijo, Prvomajjska ulica 1, 2000 Maribor. Korespondenca/correspondence: urska.kramar@nlzoh.si,

² Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Center za medicinsko mikrobiologijo, Gosposvetska 12, 4000 Kranj. Korespondenca/correspondence: helena.ribic@nlzoh.si

UVOD

Okužbe sečil so, takoj za okužbami dihal, med najpogostejšimi okužbami tako v domačem kot v bolnišničnem okolju in eden od najpogostejših vzrokov za predpisovanje antibiotičnega zdravljenja. Pri odraslih je ocenjena letna incidenca okužb sečil 2–3 %. Z vidika javnega zdravja je med drugim skrb vzbujajoče naraščanje odpornosti *E. coli* – pa tudi drugih povzročiteljev – proti večini protimikrobnih zdravil (1).

V ZDA je zaradi okužbe sečil vsako leto pri osebnem zdravniku obravnavanih 7 milijonov bolnikov, milijon bolnikov pomoč poišče v ustanovi nujne medicine, sto tisoč bolnikov pa se zdravi bolnišnično. Zaradi okužbe sečil obišče zdravnika bistveno več žensk. Tretjina žensk do 24. leta vsaj enkrat zbolijo za okužbo sečil, ki zahteva zdravljenje z antibiotikom. Polovica vseh žensk bo vsaj enkrat v življenju zbolela za okužbo sečil. Skupine s povečanim tveganjem za okužbe sečil so zlasti novorojenčki, nosečnice, starostniki, bolniki z vstavljenimi katetri, bolniki s sladkorno boleznijo, multiplo sklerozo in bolniki, okuženi s HIV. Okužbe sečil zaradi vstavljenih urinskih katetrov so najpogostejše okužbe, povezane z zdravstveno oskrbo, in najpogostejša oblika okužbe v negovalnih ustanovah ter domovih za starostnike. Letni stroški, povezani z okužbami sečil, v ZDA dosegajo tudi 2 milijardi dolarjev (2).

Okužbe sečil glede na anatomsko mesto delimo na okužbe spodnjih sečil in okužbe zgornjih sečil, glede na klinični potek pa na zapletene in nezapletene. Pri večini nezapletenih okužb sečil izoliramo enega povzročitelja, zapletene okužbe sečil in okužbe sečil v bolnišničnem okolju pa so v do 30 % polimikrobne (1). Nezapletene okužbe lahko opredelimo kot akutne, sporadične ali ponavljajoče se okužbe spodnjih (nezapleteni cistitisi) ali zgornjih sečil (nezapleteni pielonefritisi) pri predmenopavzalnih ženskah, ki niso noseče in nimajo

pomembnih anatomskih ali funkcionalnih sprememb sečil ali sočasnih drugih boleznih. Vse druge okužbe sečil štejemo za zapletene; torej pri moških, nosečnicah, pri bolnikih z boleznimi sečil ali z vstavljenimi trajnimi katetri in/ali s sočasnimi drugimi boleznimi, ki vplivajo na bolnikov imunski odziv (npr. sladkorna bolezen) (3). Nezanemarljiv delež izolatov, ki porastejo po primarni nacepitvi, lahko pripišemo onesnaženju z normalno mikrobioto perineja, uretre, zunanlega spolovila in vagine ob odvzemu. Zato je pomembno, da se vzorci urina odvezemajo in transportirajo v skladu z veljavnimi smernicami in priporočili (2).

Najpogostejši povzročitelj okužb sečil je *Escherichia coli*, v domačem okolju povzroča kar do 90 % okužb. V prospektivni raziskavi primerov nezapletenega cistitisa v Sloveniji je bila *Escherichia coli* ugotovljena v 69,9 % (4). V primeru okužb, povezanih z zdravstvom, pa je delež *E. coli* do 50 %. Med povzročitelji po pogostosti sledijo *Klebsiella* spp. in *Proteus* spp. z deleži do 10 %. Pri bolnikih z vstavljenim urinskim katetrom najpogosteje osamimo *Proteus mirabilis*, medtem ko druge enterobakterije osamimo redkeje, večinoma pri bolnikih, zdravljenih v bolnišnicah. Manjše deleže med povzročitelji imajo še *Pseudomonas aeruginosa* in enterokoki. Omeniti moramo še *Staphylococcus saprophyticus*, ki je povzročitelj okužb predvsem pri mlajših ženskah, in sicer v 5 do 20 %, v raziskavi v Sloveniji je dosegel 11 % (4). *Streptococcus agalactiae* izoliramo pri osebah z asimptomatsko bakteriurijo ter pri okužbah pri starostnikih, nosečnicah in imunsko oslabljenih bolnikih. Med oportunističnimi mikroorganizmi prevladujejo *Aerococcus* spp., najpogosteje *A. urinae*, *Corynebacterium urealyticum* in *Actinobaculum schaalii* (1).

ODVZEM VZORCEV

Kljub uvajanju novih pristopov pri preiskavi in vrednotenju rezultatov mikro-

biološke preiskave urinov urinokultura še naprej ostaja zlati standard. Urin je v osnovi sterilna telesna tekočina (5). Vzorec lahko odvezamo na različne načine. Najpogostejši je odvzem srednjega curka urina ob spontanem mokrenju. Pri majhnih otrocih odvezamo urin v vrečko z zbiralnikom ali brez nje, sicer pa lahko urin glede na klinično stanje bolnika odvezamo tudi z enkratno katetrizacijo, iz stalnega katetra, iz urostome, ureterostome, nefrostome, ob cistoskopiji, s suprapubično punkcijo ali vzamemo izpirrek sečnega mehurja. Ob sumu na prostatitis urin odvezamo pred masažo prostate in po njej (6). *Če je le mogoče, vzorec odvezamo pred začetkom zdravljenja z antibiotikom.*

Odvzem srednjega curka urina po metodi čistega mokrenja

Večina vzorcev pri odraslih bolnikih je odvzeta neinvazivno, s spontanim mokrenjem. Najprimernejši in najpogostejši vzorec je odvzem srednjega curka prvega jutranjega urina po metodi čistega mokrenja. Pred oddajo vzorca je potrebno bolniku razložiti, kako naj urin odda. Če bo vzorec oddal doma, je zaželeno, da mu prihrubimo tudi pisna navodila. Mnenja o čiščenju spolovila pred odvzemom so sicer deljena, a nekatere raziskave potrjujejo, da s čiščenjem spolovila zmanjšamo delež kontaminacij (2). Pri ženskah je za čiščenje priporočljivo uporabiti dva mokra in en suh zloženeček. Čistimo z enkratnim potegom z zloženci oziroma gazo. Pri moških je med čiščenjem treba potegniti nazaj prepucij, pri ženskah pa razmakniti sramni ustnici in čistiti od spredaj nazaj. Pred odvzemom urina se mora spolovilo posušiti. Po čiščenju bolnik prvo tretjino urina spusti v stranišče ali nočno posodo, nato brez prekinitve uriniranja 5–10 ml urina prestreže v sterilno urinsko posodico na zaklop ali navoj, ki neprepustno tesni (5).

Odvzem urina s katetrom in iz katetra

Kadar neinvazivni odvzem ni mogoč, je potrebna katetrizacija bolnika. Ta je lahko enkratna, kadar bolnik ne more odvajati urina spontano ali kadar ne sodeluje. V primeru enkratne katetrizacije očistimo uretralno področje, kateter uvedemo aseptično, nato približno 15 ml urina zavržemo. Približno 10 ml urina za analizo pa zberemo v sterilno posodico (5).

Pri bolnikih s kratkotrajnim ali trajnim katetrom urin odvezamo iz porta. Če porta ni, ga odvezamo iz cevke katetra. Mesto odvzema vzorca razkužimo. Aseptično s sterilno iglo na brizgi aspiriramo približno 10 ml urina in ga prenesemo v sterilno posodico (7).

Konica urinskega katetra ni primerna za mikrobiološko preiskavo, enako velja za odvzem urina iz zbirne vrečke, zato takšne vzorce v mikrobiološkem laboratoriju praviloma zavrnamo (8).

Pri bolnikih s trajnim urinskim katetrom obstaja velika verjetnost, da je v katetru biofilm, iz katerega se sproščajo bakterije ali glive, ki niso nujno povzročitelji okužbe. Zato v primeru, da je vstavljen več kot dva dni, kateter pred odvzemom vzorca zamenjamo. Vzorec vzamemo takoj po menjavi iz novega katetra (8).

Odvzem s suprapubično aspiracijo

Suprapubična aspiracija (SPA) je invazivna metoda, s katero dobimo vzorec neposredno iz sečnega mehurja in pokaže dejansko število mikrobov v mehurju. S perkutano punkcijo s sterilno iglo in brizgalko aspiriramo urin iz mehurja in ga prenesemo v sterilno posodico ali pustimo v brizgalki. Postopek izvedemo aseptično. Pred izvedbo se priporoča ultrazvočni pregled napolnjenosti sečnega mehurja. Urin, odvzet s SPA, je primeren tudi za preiskavo na anaerobne bakterije.

V primerjavi z drugimi načini SPA zagotavlja najmanj lažno pozitivnih rezultatov, vendar za preiskovanca ni povsem brez nevarnosti. Opisani zapleti pri SPA (prehodna hematurija, perforacija črevesja) so sicer redki, vendar že invazivnost metode po mnenju mnogih omeji njeno uporabnost na primere, kjer nas neinvazivne metode pustijo v diagnostičnem dvomu (na primer pri novorojenčkih in majhnih otrocih) (9).

Odvzem urina pri bolniku z nefrostomo, cistostomo in urostomo

Pri bolnikih z zaporo sečnih poti, s fistulo ali zaradi kakšnih drugih razlogov se lahko uporabijočasne ali trajne rešitve za odvod urina. Med njimi so nefrostoma, cistostoma, urostoma (ilealni kanal). Pri odvzemih vzorcev urina v navedenih primerih postopek izvedemo aseptično – uporabljamo sterilne rokavice in aseptično tehniko. Vzorcev urina ne jemljemo iz zbiralne (nefrostomske, cistostomske ali urostomske) vrečke ali iz obposteljne drenažne vrečke.

Nefrostoma je perkutano ali kirurško narejena odprtina med votlim sistemom ledvice in površino telesa. Nefrostomski kateter v ledvenem predelu vstopa v ledvični meh in zagotavlja začasno ali trajno drenažo urina v primerih, ko je zapora sečne poti nižje od ledvice (10).

Odvzem urina opravimo aseptično. Iz nefrostomske cevke snamemo vrečko. Konec cevke pobrišemo z razkužilom in počakamo, da se posuši. Urin odvezamo iz nefrostomske cevke, ki jo po potrebi predhodno pobrizgamo s sterilno fiziološko raztopino. Cevke nikoli ne aspiriramo, ampak pustimo, da urin spontano izteče. Prvih nekaj kapelj pustimo odteči na sterilno gazo. Najmanj 10 ml urina odvezamo v sterilno posodico (11, 12).

Cistostoma je cevka, ki je skozi trebušno steno vstavljena neposredno v sečni me-

hur. Uporabljamo jo v primerih, ko zaradi različnih razlogov ni mogoče vstaviti stalnega urinskega katetra, ker je zapora urina v sečnici, vratu sečnega mehurja ali v predelu prostate. Za odvajanje urina iz mehurja se lahko, kot alternativa stalnemu uretralnemu katetru, uporablja suprapubični kateter – cistofix. Lahko se vstavi kot začasni ali trajni ukrep pri bolnikih z disfunkcijo sečil ali če je začetna vstavitev uretralnega katetra ali rekateterizacija problematična. Podobno kot pri uretralnem katetru se biofilmi lahko tvorijo že po 48 do 72 urah, zato je treba pred odvzemom vzorca kateter, ki je nameščen dalj časa, zamenjati in šele nato odvzeti vzorec v sterilno, za to namenjeno posodico (13).

Pri **urostomi** je urin speljan po umetni poti na trebušno steno, kjer prosto odteka. Poseg je največkrat posledica malignega obolenja sečnega mehurja, ki ga v celoti odstranijo in naredijo novega iz dela tankega ali debelega črevesa, ki ga všijajo kot premostitveno cev. Cevka je na enem koncu spojena s sečevodomom, na drugem pa izpeljana na kožo kot urostoma. Običajno je izpeljana na desnem spodnjem delu trebuha, kjer seč stalno izteka. Nadomešča sečni mehur in sečnico. Ugotavljanje okužbe iz vzorca urina je težavno, ker je sluznica tankega črevesja praviloma poseljena z mikrobi, predvsem bakterijami. Vzorcev urina ne jemljemo iz urostomske vrečke ali obposteljne drenažne vrečke. Pri bolnikih z enodelnim sistemom vrečk tega odstranimo, odvezamo vzorec in namestimo novo vrečko. Pri bolnikih z dvodelnim sistemom vrečk lahko izbiramo med sledečima možnostma: urostomsko vrečko odstranimo, odvezamo vzorec v zbiralno vrečko in vrečko ponovno namestimo. Ali pa sistem urostomske vrečke popolnoma odstranimo, odvezamo vzorec in namestimo novo vrečko.

Vzorec iz urostome lahko odvezamo z namestitvijo zbiralne vrečke ali z enkra-

tno katetrizacijo. Stomo očistimo s čistilno raztopino s krožnimi gibi od odprtine navzven. Osušimo s sterilno gazo. Namestimo zbiralno vrečko ali pa urin odvezamo aseptično s katetrom. Kateter pred uporabo premažemo z vodotopnim lubrikantom. Če uporabimo enolumenski ravni kateter, konic katetra vstavimo 5–7,5 cm globoko (do rezervoarja seča), pri dvolumenskem katetru pa približno 2,5–5 cm globoko. Kateter vstavljamo nežno in nikoli ne uporabljamo sile. Če zaznamo upor, kateter nežno zavrtimo, dokler ne zdrsne naprej. Držimo ga v tem položaju in počakamo, da urin spontano izteče. Zberemo 3–5 ml urina, kar običajno traja 5 do 15 minut. Po odvzemu stomo in okoliško kožo očistimo in posušimo. Namestimo novo vrečko. Najnatančnejša je metoda odvzema z uporabo sterilnega katetra z dvojnimi lumnami, vstavljenega neposredno v stomo (14).

Če katetra nimamo na voljo, urin odvezamo s spontanim odtekanjem. Predel v okolici stome očistimo z zložencem, navlaženim s sredstvom za čiščenje (priporočajo se povidon-jod, klorheksidin, milo in voda). Čistimo s krožnimi gibi od stome navzven, nato obrišemo še s sterilnim zložencem. Pustimo, da nekaj kapelj urina odteče (ujamemo v sterilno gazo) in nato podstavimo sterilno posodico. Zbiranje urina običajno traja 5 do 10 minut. Po zbiranju stomo ponovno očistimo in obrišemo s sterilnim zložencem (14).

Odvzem pri majhnem otroku

Odvzem urina pri otrocih je odvisen od starosti. Če je mogoče, izberemo metodo čistega mokrenja. Pri novorojenčkih in mlajših otrocih pa je odvzem urina pogosto izziv. Čeprav je enkratna katetrizacija najprimernejša metoda, s katero pridobimo primeren vzorec in se izognemo kontaminaciji, ima odvzem urina z vrečko z zbiralnikom ali brez njega še vedno pomemben in nezanemarljiv delež. Odvzem

urina v vrečko je neinvaziven poseg z veliko možnostjo kontaminacije vzorca z uretralno in periuretralno mikrobioto. Pri odvzemu z zbiralnikom ujamemo zadnji curek urina, s tem se možnost kontaminacije zmanjša. Predel zunanjega spolovila in kožo v okolici temeljito očistimo. Koža okrog spolovila mora biti suha, ne smemo je namazati s kremo, da se vrečka po namestitvi ne odlepi. Sterilno vrečko namestimo tako, da pokrije spolovilo. Vrečka ne sme biti nameščena več kot eno uro, če otrok v tem času ne urinira, moramo namestiti novo. Urina iz vrečke ne prelivamo, ampak vrečko neprodušno zalepimo in vstavimo v sterilno posodico za odvzem. Analiza urina, odvzetega z vrečko, naj bi v kar 63 % podala lažno pozitivne rezultate (15). Zato so komunikacija in sodelovanje naročnika in mikrobiološkega laboratorija ter vrednotenje dobljenih rezultatov izrednega pomena.

Odvzem prvega curka urina

K odvzemu urina se zatekamo tudi pri dokazovanju povzročiteljev spolno prenosljivih bolezni. Odvezamo prvi curek prvega jutranjega urina, sprejemljiv je tudi prvi curek urina, odvzet najmanj 2–3 ure po mokrenju. V prvem curku urina je koncentracija povzročiteljev največja, zato je pomembno, da zajamemo prav ta del. Urin odvezamo v temu namenjeno sterilno posodico. Odvezamo več kot 15 ml, a največ polovico posodice (16).

Komercialna gojišča za kultivacijo bakterij iz urina

V vsakodnevni mikrobiološki diagnostiki okužb sečil se uveljavljajo tudi metode nacepitve urina na komercialna gojišča različnih proizvajalcev, kot so: Uritest, Uricult, Uriline in druga. Treba je poudariti, da je ta metoda orientacijska, semikvantitativna. Na nosilec, ki je pritrjen na zamašek v plastičnem tulcu, je nanosenih več

vrst gojišč (običajno 2 do 3). Največkrat sta to CLED-agar (gojišče, na katerem rastejo po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije) in MacConkey-agar (selektivno gojišče za bakterije, negativne po Gramu), lahko je dodano še gojišče za bakterijo *Escherichia coli*. Običajno te preiskave opravi osebje v biokemijskih laboratorijih ali zdravstveno osebje, ki obravnava bolnika, tako da urin prelijejo po ploščici z gojiščem, ki se nato inkubira. Po predpisanim času (običajno 16–24 ur) ocenijo število kolonij po priloženi shemi proizvajalca. Če ocenijo, da je rezultat preiskave pozitiven, pošljejo ploščico v nadaljnjo preiskavo (osamitev, identifikacijo in antibiogram) v mikrobiološki laboratorij. Takšen pristop ima nekatere slabosti. Testi bi morali biti pred uporabo preverjeni in vključeni v sheme preverjanja kakovosti. Števíla CFU/ml mikrobiološki laboratorij v izvidu ne sporoča, saj je število kolonij CFU/ml treba oceniti po določenem času in po shemi, ki ju določi proizvajalec, kar ob sprejemu v mikrobiološki laboratorij ni izvedljivo. V mikrobiološkem laboratoriju s pregledom gojišč ocenimo, ali je vzorec primeren za nadaljnjo obdelavo. Posamezne morfološke različne kolonije precepimo, da dobimo čisto kulturo, iz katere nato izvedemo nadaljnje teste (17).

OZNAČEVANJE VZORCEV IN IZPOLNJEVANJE SPREMNEGA LISTA ZA MIKROBIOLOŠKO PREISKAVO

Posodico z vzorcem opremimo s podatki o bolniku in z datumom ter uro odvzema. Pred pošiljanjem preverimo, ali je posodica nepredušno zaprta. Z razlitjem je vzorec lahko izgubljen, zaradi kontaminacije pa predstavlja tudi nepotrebno izpostavljenost laboratorijskih delavcev mikrobom. Prav tako je za ustrezno obravnavo in obdelavo vzorca treba navesti, katero preiskavo želimo naročiti in za kakšen odzvem

gre: navedemo način odvzema in ali smo odvzeli prvi ali srednji curek urina. Interpretacija rezultatov preiskave se pri različnih načinih odvzema pomembno razlikuje, na primer pri odvzemu srednjega curka urina je interpretacija drugačna kot pri urinu, odvzetem z enkratno katetrizacijo, in drugačna kot pri urinu, odvzetem iz trajnega katetra (2).

PRENOS VZORCEV

Če se prenos vzorcev urina in komercialnih gojišč (Uricult in druga) do laboratorija opravi znotraj 2 ur, jih lahko pošljemo na sobni temperaturi, sicer vzorce do prenosa hranimo v hladilniku pri 4 °C, za prenos uporabimo hladilno torbo. Čas od odvzema do sprejema vzorca v mikrobiološki laboratorij ne sme biti daljši od 24 ur (6).

KRITERIJI ZA ZAVRNITEV VZORCEV

Pomembni kriteriji, ki bistveno vplivajo na obdelavo in končni rezultat preiskave in jih je nujno treba upoštevati, so vsekakor tudi način in ustreznost odvzema določene kužnine ter hranjenje in/ali prenos kužnine. Pri nepravilnem odvzemu ali prevozu vzorca nikoli ne zavržemo, dokler se z naročnikom ne dogovorimo, ali je mogoč ponoven odzvem. Zavrnitev vzorca in razloge vedno zapišemo. Pošiljatelja obvestimo in vzorce teoretično zavrnilo, kadar v obdelavo prejmemo vzorce brez spremnega lista ali nepopolno izpolnjene spremnega lista, na katerih manjkajo bistveni podatki o bolniku ali pošiljatelju, oziroma kadar se podatki na embalaži z vzorcem in spremnem listu ne ujemajo, ni pa jih mogoče pridobiti naknadno od pošiljatelja. Ravno tako zavrnilo vzorce, pri katerih je posodica s kužnino pomanjkljivo označena in manjkajo podatki o bolniku ali odvzemu, kar onemogoča zanesljivo ugotavljanje istovetnosti. Neprimerni so tudi vsi vzorci urina, odvzeti pred več kot 24 urami, tudi

če so bili shranjeni pri 4 °C, in vzorci urina, poslani na preiskavo na anaerobne bakterije, če niso odvzeti s suprapubično punkcijo, v tem primeru v laboratoriju opravimo le preiskavo na aerobne bakterije. Prav tako zavrnemo kužnine, ki so se razlile ali so poslani v nesterilni, neustrezni ali poškodovani embalaži (2).

Nepravilnosti pri odvzemu in prenosu vzorcev lahko pomembno vplivajo na rezultate mikrobioloških preiskave, ogroženo je lahko tudi zdravstveno osebje, ki opravlja analize, zato vzorce, ki ne ustrezajo uveljavljenim mikrobiološkim standardom, praviloma zavrnemo (4).

ZAKLJUČEK

Mikrobiološke preiskave urina predstavljajo pomemben delež vseh preiskav v mikrobioloških laboratorijih. Vendar je ob okužbah sečil treba ravnati v skladu s smernicami; če predvidevajo mikrobiološko preiskavo urina, je treba vzorce odvzeti ter čim prej določiti povzročitelja in njegovo odpornost proti protimikrobnim zdravilom. Ti podatki so zaradi naraščajoče odpornosti bakterij proti protimikrobnim zdravilom pomembni za zdravljenje. Ravnati moramo tako, da je čas od odvzema kužnine do rezultata preiskave čim krajši, saj s tem zagotovimo krajše in uspešnejše zdravljenje.

LITERATURA

- Križan HV, Logar M. Diagnostika in etiologija okužb sečil v Sloveniji. Infektološki simpozij. 2017 Okt 20–21; Ljubljana; Slovenija. V Ljubljani: Sekcija za protimikrobno zdravljenje SZD. 2017;163–164.
- LaRocco MT, Franek J., Leibach EK. et al. Effectiveness of preanalytic practices on contamination and diagnostic accuracy of urine cultures: a laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(1):105–47.
- Koder B. Pogled kliničnega farmacevta na zdravljenje vnetij sečil ter pojav sečnih kamnov. *Farmaceutski vestnik.* 2014;65(1):282–93.
- Ribič H, Dermota U, Štrumbelj I., et al. Nezapletene okužbe sečil v Sloveniji. 9. Likarjev simpozij: Okužbe sečil. *Med Razgl.* 2019;58Suppl4:39–46.
- Leber AL. *Clinical microbiology procedures handbook.* 4th ed. Washington, D.C.: American Society of Microbiology. 1992.
- Kubik MJ, McCarter YS. Controversies in the diagnosis of urinary tract Infections. *Clinical Microbiology Newsletter.* 2012;34(23):185–91.
- Cavallo JD, Tenke P. Urinary tract infection. In: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Peigue-Lafeuille H, Vila J, eds. *European Manual of Clinical Microbiology (EMCM), 1st Edition.* ESCMID, Societe Francaise de Microbiologie. c2012;133–43.
- Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2010;50(5):625–663.
- Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, et al. *A Guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018. Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology.* *Clin Infect Dis.* 2018;67(6):e1–e94.
- Pašek M. Odvzem seča v dispanzerju za otroke. 11. Derčevi dnevi. 1989; Ljubljana, Slovenija. V Ljubljani: Medicinska fakulteta. 1989;237–40.
- Yoo MJ., Bridwell RE, Inman, BL, et al. Approach to nephrostomy tubes in the emergency department. *The American journal of emergency medicine.* 2021;50:592–596.
- Collection of urine sample from a nephrostomy tube [internet]. Agency for Clinical Innovation; c2022 [cited 2023 Mar 22]. Available at: <https://aci.health.nsw.gov.au/>.
- Mahmood RD, Yizhi L, Tan M. Percutaneous Nephrostomy. *Chronic Kidney Disease.* 2012;298–313.
- Robinson J. Insertion, care and management of suprapubic catheters. *Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain)).* 1987;23(8):49–58.

15. Mahoney M, Baxter K, Burgess J., et al. Procedure for Obtaining a Urine Sample From a Urostomy, Ileal Conduit, and Colon Conduit. A Best Practice Guideline for Clinicians. *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing*. 2013;40(3):277–279.
16. Doern DC, Richardson ES. Diagnosis of urinary tract infections in children. *J Clin Microbiol*. 2016;54(9):2233–42.
17. European Confederation of Laboratory Medicine (ECLM). European urinalysis guidelines. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000;60:1–96.

