

Badanie mikrobiologiczne płynów z jam ciała

Dorota Olszańska

Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej
i Immunologii Infekcyjnej
USK w Białymstoku

Kierownik

Prof. Dr hab. n. med. Elżbieta Tryniszewska

Cel badań mikrobiologicznych

- Identyfikacja drobnoustroju
- Ustalenie lekowrażliwości
- Wykrycie mechanizmów oporności
- Wykrycie i raportowanie patogenów alarmowych

Wymagania ogólne pobierania materiałów



- ❖ materiały do badań bakteriologicznych i mykologicznych pobierają osoby upoważnione
- ❖ materiał biologiczny do badań bakteriologicznych i mykologicznych pobiera się przed rozpoczęciem leczenia przeciwdrobnoustrojowego,
- ❖ przy pobieraniu materiału od pacjenta u którego już wcześniej rozpoczęto terapię, zaznacza się ten fakt na skierowaniu podając nazwę antybiotyku oraz okres jego podawania, a materiał pobiera się przed podaniem kolejnej dawki
- ❖ badanie kontrolne po leczeniu przeciwdrobnoustrojowym wykonuje się co najmniej po trzech dniach od zakończenia podawania antybiotyku.
- ❖ liczba drobnoustrojów na wacikach jest niska, zatem wymazy pobiera się tylko wtedy, kiedy nie da się uzyskać nawet niewielkiej objętości wydzieliny

Wymagania ogólne cd:

- ❖ laboratorium otrzymuje często zbyt mało materiału do przeprowadzenia wystarczającej liczby badań, dlatego należy zwrócić uwagę na objętość próbek
- ❖ największą wartość diagnostyczną mają badania materiałów fizjologicznie jałowych takich jak krew, płyn mózgowo-rdzeniowy i inne płyny ustrojowe (płyn stawowy, otrzewnowy, z jamy opłucnej)
- ❖ przy podejrzeniu zakażenia spowodowanego przez bakterie beztlenowe przy pobieraniu próbek należy przestrzegać specjalnych zaleceń. Badania w kierunku beztlenowców zasadniczo dotyczą materiałów pochodzących z fizjologicznie jałowych jam ciała: wszelkiego rodzaju punktatów i aspiratów, rzadziej wymazów. Przy pobieraniu wymazu, należy zwrócić uwagę aby wymazówka była całkowicie nasycona badanym materiałem i umieszczona w odpowiednim podłożu transportowym (tzw czarny żel).

Kierunki badań

- -posiew w kierunku bakterii tlenowych
- -posiew w kierunku bakterii mikroaerofilnych
- -posiew w kierunku bakterii beztlenowych
- -posiew w kierunku grzybów

**Do każdego pobranego materiału (próbki)
dołącza się czytelnie wypełnione skierowanie,
zawierające następujące dane:**

- Nazwisko i imię pacjenta
- Oddział
- PESEL
- Kierunek badania
- Rozpoznanie
- Rodzaj materiału
- Data i godzina pobrania
- Antybiotyki jakie pacjent przyjmował
- Antybiotyki jakie pacjent przyjmuje obecnie i/lub planowane do podania
- Nazwisko i imię, podpis, stanowisko służbowe osoby pobierającej materiał do badań
- Nazwisko i imię, podpis lekarza zlecającego badanie

Krew



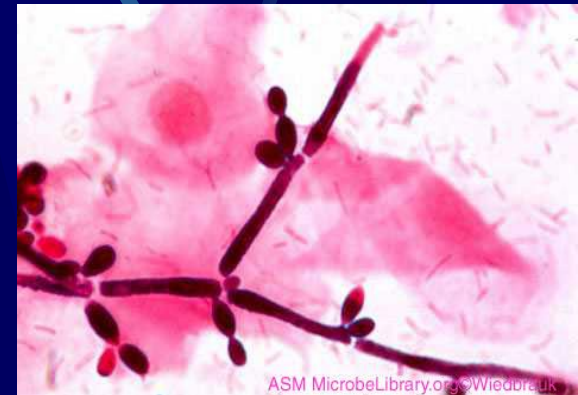
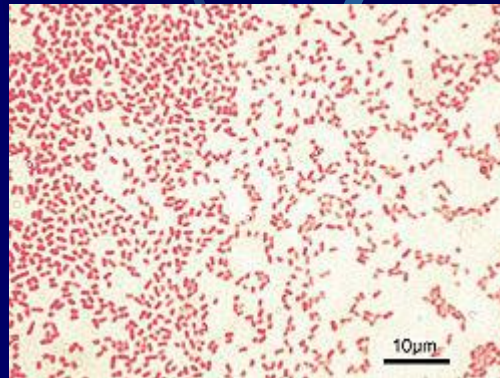
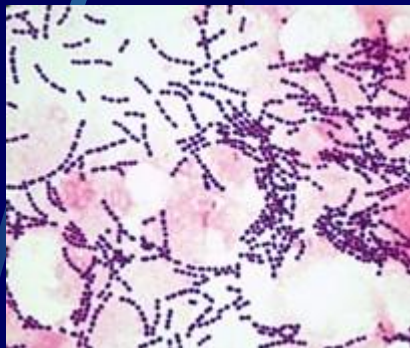
Wiele typów zakażeń przebiega z wysiewem drobnoustrojów z ogniska zakażenia do krwi.

Opis pobrania:

- krew pobiera się w momencie narastania temperatury (około 30 minut przed osiągnięciem szczytu) lub jak najszybciej po pojawieniu się gorączki
- w ostrym klinicznym przebiegu zakażenia z utrzymaniem się wysokiej gorączki i przy konieczności natychmiastowego wdrożenia leczenia przeciwbakteryjnego, zalecane jest pobranie krwi z dwóch różnych włąć bezpośrednio po sobie
- w przypadku występowania gorączki o znanej przyczynie, zaleca się wykonanie dwóch posiewów krwi w odstępach około godzinnych, a w razie potrzeby badanie należy powtórzyć po 24 – 48 godzinach
- jeżeli zachodzi konieczność wykonania badania bakteriologicznego krwi w trakcie prowadzonej antybiotykoterapii, krew na posiew należy pobrać przed podaniem kolejnej dawki leku, gdy jego stężenie w surowicy pacjenta jest najniższe
- przed pobraniem krwi dokładnie myje się i dezynfekuje ręce preparatem dezynfekcyjnym przeznaczonym do tego celu wg procedury mycia i dezynfekcji rąk.

Barwienie Grama

- Bakterie Gram+ fioletowe
- Bakterie Gram- różowe



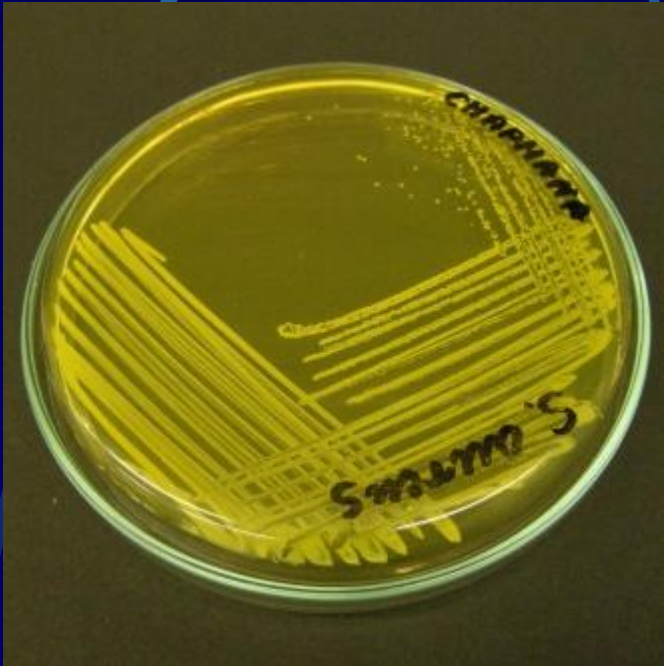
Clostridium-spory



Identyfikacja drobnoustrojów



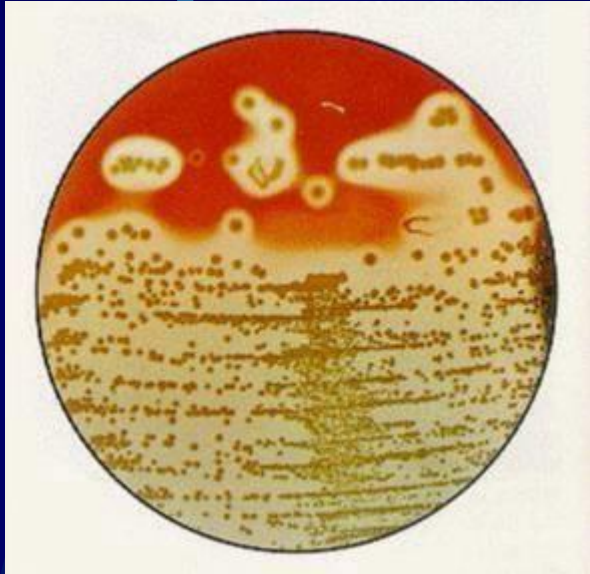
Staphylococcus spp



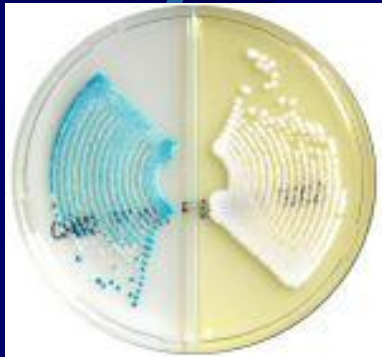
Enterobacteriaceae spp



Streptococcus



Candida spp



Interpretacja testów lekowrażliwości

- Od 11 kwietnia 2011 roku w Polsce stosowane są zalecenia EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
- Opracowano stronę internetową www.eucast.com (dostęp bezpłatny)
- Strona oryginalna ma połączenie do baz charakterystyk leku (dokumenty RD) oraz do rozkładów wartości MIC dla poszczególnych gatunków drobnoustrojów. **Wartości graniczne skorelowane są z dawkowaniem leków.** Ostatnia aktualizacja dokumentu z wartościami granicznymi MIC i stref zahamowania wzrostu bakterii 12.01.2012



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

[Organization](#)

[Clinical breakpoints](#)

[Expert rules](#)

[MIC - distributions and QC](#)

[Zone diameter distributions](#)

EUCAST disk diffusion test

[General information](#)

[Implementation guide](#)

[Breakpoint tables](#)

[Disk diffusion methodology](#)

[QC Tables](#)

[Older versions of tables](#)

[Frequently Asked Questions \(FAQ\)](#)

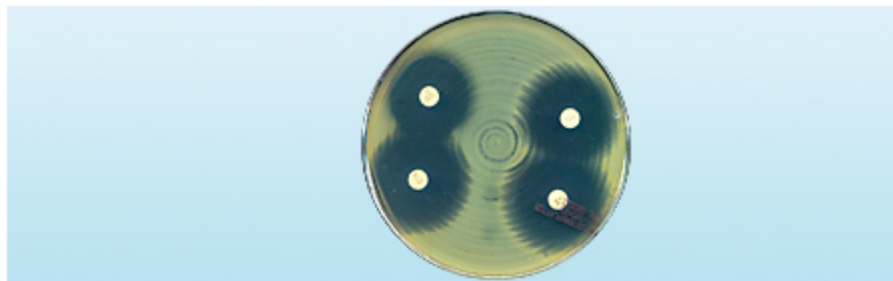
[Meetings](#)

[EUCAST Presentations](#)

[Documents](#)

[Information for industry](#)

[Links](#)



EUCAST disk diffusion test for routine antimicrobial susceptibility testing

During 2009 - 2010 EUCAST is developing a disk diffusion test for routine antimicrobial susceptibility testing. ESCMID has decided to take responsibility for the development and upkeep of the EUCAST disk diffusion test over the next several years.

The method is derived from the Kirby-Bauer method, variants of which are currently widely used in Europe, but is calibrated to EUCAST MIC breakpoints.

The method is based on two media, Mueller-Hinton agar without supplements (MH) for non-fastidious organisms, including enterococci, and MH with 5 % horse blood and 20 mg β -NAD/L (MH-F) for *Streptococcus* spp. including *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* spp. and other fastidious organisms.

The plates are incubated at 35 ± 1 °C for 18 ± 2 h within 15 minutes from application of the disks. MH plates are incubated in air and MH-F plates in 5% CO₂.

Breakpoint tables with tentative zone diameter breakpoints were published December 21, 2009.

EUCAST breakpoints and commercially available material and systems for AST - important information to laboratories (updated 2010-03-16).

Streptococcus groups A, B, C and G

EUCAST Clinical Breakpoint Table

Fluoroquinolones	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Ciprofloxacin	-	-		-	-	
Levofloxacin	1	2	5	18	15	
Moxifloxacin	0.5	1	5	18	15	
Nalidixic acid (screen)	NA	NA		NA	NA	
Norfloxacin (screen)	NA	NA	10	12 ^A	12 ^A	A. The norfloxacin disk diffusion test can be used to screen for fluoroquinolone resistance. Isolates susceptible can be reported susceptible to levofloxacin and moxifloxacin. Isolates categorized as tested for susceptibility to individual agents.
Ofloxacin	-	-		-	-	

Aminoglycosides	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Amikacin	-	-		-	-	
Gentamicin	-	-		-	-	
Netilmicin	-	-		-	-	
Tobramycin	-	-		-	-	

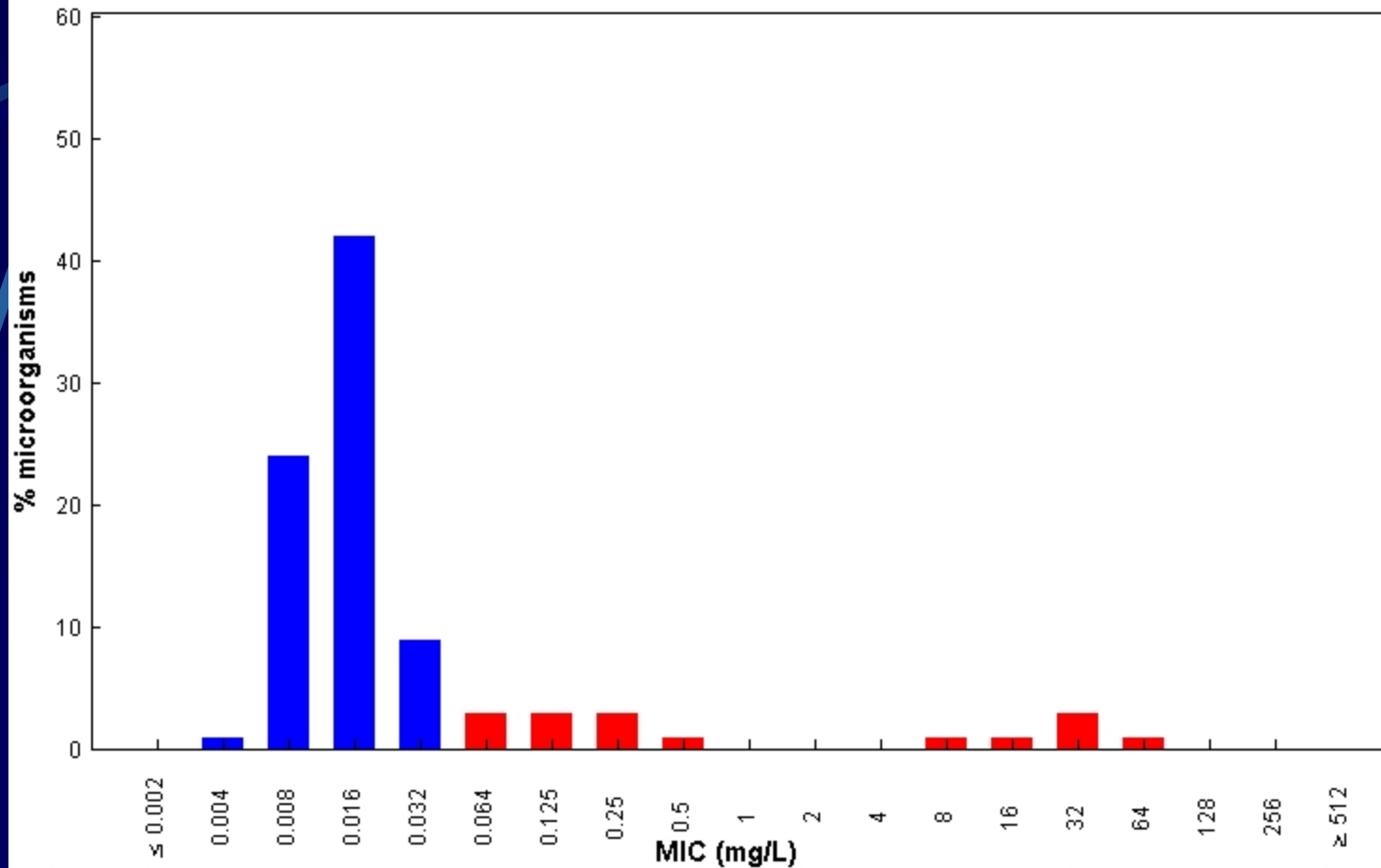
Glycopeptides	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Teicoplanin	2 ¹	2	30	15 ^A	15 ^A	1. Strains with MIC values above the susceptible breakpoint are very rare or not yet reported. The antimicrobial susceptibility tests on any such isolate must be repeated and if the result is confirmed sent to a reference laboratory. Until there is evidence regarding clinical response for confirmed isolates at current resistant breakpoint they should be reported resistant. A. Zone diameter breakpoints are based on wild type distributions as there are currently no resistant strains.
Vancomycin	2 ¹	2	5	13 ^A	13 ^A	

Oporność mikrobiologiczna i epidemiologiczne wartości graniczne

- Szczep dziki (ang. wild type WT)- należy do najbardziej wrażliwej populacji, nie posiada nabytych oporności na dany lek. Jest charakteryzowany fenotypowo przez zastosowanie odpowiedniego punkt odcięcia wartości MIC dla danego gatunku. Szczep może nie odpowiadać na leczenie danym lekiem.
- Szczep z oporność mikrobiologiczna (ang. Non-Wild Type NWT)- szczep posiadający nabyte drogą transferu lub mutacji mechanizmy oporności na dany lek. Jest charakteryzowany fenotypowo przez zastosowanie odpowiedniego punkt odcięcia wartości MIC dla danego gatunku. Szczep może nie odpowiadać na leczenie danym lekiem.
- $WT \leq x \text{ mg/l}$, $NWT > x \text{ mg/l}$

Ciprofloxacin / Escherichia coli
EUCAST MIC Distribution - Reference Database 2011-03-07

MIC distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance



MIC

Epidemiological cut-off: WT ≤ 0.032 mg/L

17877 observations (82 data sources)

Clinical breakpoints: S ≤ 0.5 mg/L, R > 1 mg/L

Oporność kliniczna i wartości graniczne

- Wrażliwość kliniczna- drażliwość drobnoustroju na standardowe dawki leku. Wysokie prawdopodobieństwo sukcesu terapeutycznego
- Kliniczna średnia drażliwość- szczep w zakresie wartości MIC pomiędzy S a R. Efekt terapeutyczny niepewny, ale może być osiągnięty jeżeli w miejscu zakażenia lek będzie fizycznie zagęszczony (np. drogi moczowe) lub istnieje możliwość podania wysokich dawek leku
- Kliniczna oporność- wysokie prawdopodobieństwo niepowodzenia terapeutycznego, nawet przy wysokich dawkach leku
- Wartości kliniczne są skorelowane z dawkowaniem leku, farmakokinetyką i farmakodynamiką leku.

S. pneumoniae/ Penicylina benzykowa

S ≤ 0.064

R > 2

2. **W zapaleniu płuc**, przy stosowaniu dawki 1.2 g x 4, za wrażliwe na penicylinę benzykową należy uznać izolaty dla których wartość MIC wynosi ≤ 0.5 mg/L.
W zapaleniu płuc, przy stosowaniu dawki 2.4 g x 4 lub 1.2 g x 6, za wrażliwe na penicylinę benzykową należy uznać izolaty dla których wartość MIC wynosi ≤ 1.0 mg/L.
W zapaleniu płuc, przy stosowaniu dawki 2.4 g x 6, za wrażliwe na penicylinę benzykową należy uznać izolaty dla których wartość MIC wynosi ≤ 2.0 mg/L.
W zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych za wrażliwe na penicylinę benzykową należy uznać **wyłącznie** izolaty dla których wartość MIC wynosi ≤ 0.06 mg/L (wrażliwe na oksacylinę w badaniu przesiewowym z zastosowaniem krążka z oksacyliną 1 μ g, patrz komentarz A); wszystkie izolaty nie spełniające powyższych kryteriów należy klasyfikować jako odporne. W przypadku innych zakażeń interpretować wynik dla penicyliny benzykowej wg podanych wartości granicznych 0.06/2mg/L – patrz komentarz A.

RAPORT Z BADANIA

- (1) Klebsiella pneumoniae, wzrost b. obfity
 - 1) KPC(+): Szczep wytwarza karbapenemazę KPC, rozkładającą wszystkie stosowane obecnie w leczeniu antybiotyki β -laktamowe, włącznie z karbapenemami.
- (2) Enterococcus faecalis - (Grupa D), Wzrost skapy
 - 1) bez antybiogramu
- (3) Staphylococcus CNS, wzrost srednio obfity
 - 1) bez antybiogramu
- (4) Candida albicans, Wzrost skapy
 - 1) bez mykogramu

	(1)
Amikacin	R
Amoxicillin/Clavulanic Acid	R >=32
Ampicillin	R >=32
Ampicillin/sulbactam	R
Aztreonam	R >=64
Cefepime	R >=64
Cefoperazone/Sulbactam	R
Ceftriaxone	R >=64
Ciprofloxacin	R >=4
Ertapenem	R >=8
ESBL	- Neg
Gentamicin	I 4
Imipenem	R >=16
Karbapenemaza KPC	+ Pos
Levofloxacin	R >=8
Meropenem	R >=16
Tigecycline	S 1
Tobramycin	R >=16
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	R >=320

MIC mg/l

RAPORT Z BADANIA

- (1) *Proteus mirabilis*, Bakteriuria 10 000 cfu/ml
- 1) ESBL(+): Szczep wytwarza β -laktamazę o rozszerzonym spektrum substratowym. Zgodnie z aktualnymi zaleceniami EUCAST wykrycie β -laktamaz typu ESBL nie wyklucza zastosowania cefalosporyn III i IV generacji oraz aztreonamu w przypadku stwierdzenia lekowrażliwości, istnieje jednak możliwość niepowodzenia terapeutycznego.
- (2) GRZYBÓW DROŹDZOPODOBNYCH NIE WYHODOWANO

	(1)
Amikacin	S <=2
Amoxicillin/Clavulanic Acid	R 16
Ampicillin	R >=32
Aztreonam	S <=1
Cefepime	I 8
Cefoksytyna	S
Cefotaksym	R
Ceftazidim	S
Ceftriaxone	R 8
Ciprofloxacin	R >=4
Ertapenem	S <=0.5
ESBL	+ POS
Gentamicin	R 8
Levofloxacin	R >=8
Meropenem	S <=0.25
Tobramycin	R 2
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	R >=320

MIC mg/l

RAPORT Z BADANIA

- (1) Enterococcus faecium - (Grupa D), wzrost srednio obfity
1) HLAR - szczep wykazuje oporność wysokiego stopnia na aminoglikozydy co uniemożliwia zastosowanie leczenia skojarzonego: aminoglikozydy + penicyliny/glikopeptydy.
- (2) GRZYBÓW DROŹDŻOPODOBNYCH NIE WYHODOWANO

	(1)
Ampicillin	R ≥ 32
Cefoperazone/Sulbactam	R
Gentamicin High Level (synergy)	R SYN-R
Imipenem	R ≥ 16
Linezolid	S 1
Streptomycin High Level (synergy)	R SYN-R
Teicoplanin	S ≤ 0.5
Tigecycline	S ≤ 0.12
Vancomycin	S 1

MIC mg/l

Nowe rozporządzenie obowiązujące od 2012 roku

- **ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA ¹⁾** w sprawie listy czynników alarmowych, rejestrów zakażeń szpitalnych i czynników alarmowych oraz raportów o bieżącej sytuacji epidemiologicznej szpitala z dnia 23 grudnia 2011 r.

Na podstawie art. 14 ust. 7 ustawy z dnia 5 grudnia 2008 r. o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi (Dz. U. Nr 234, poz. 1570, z 2009 r. Nr 76, poz. 641 oraz z 2010 r. Nr 107, poz. 679 i Nr 257, poz. 1723) zarządza się, co następuje:

Załącznik nr 1 LISTA CZYNNIKÓW ALARMOWYCH

- 1) gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) oporny na metycylinę (MRSA) lub glikopeptydy (VISA lub VRSA) lub **oksazolidynony**;
- 2) enterokoki (*Enterococcus* spp.) odporne na glikopeptydy (VRE) lub **oksazolidynony**;
- 3) pałeczki Gram-ujemne *Enterobacteriaceae* spp. wytwarzające betalaktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (np. ESBL, **AMPc**, **KPC**) lub odporne na karbapenemy lub inne dwie grupy leków lub **polimyksyny**;

Załącznik nr 1 LISTA CZYNNIKÓW ALARMOWYCH

- 4) pałeczka ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) oporna na karbapenemy lub inne dwie grupy leków **lub polimyksyny**;
- 5) pałeczki niefermentujące *Acinetobacter* spp. odporne na karbapenemy lub inne dwie grupy leków lub **polimyksyny**;
- 6) szczepy chorobotwórcze laseczki beztlenowej *Clostridium difficile* oraz wytwarzane przez nie **toksyny A i B**;
- 7) laseczka beztlenowa *Clostridium perfringens*;

C.D. Załącznik nr 1 LISTA CZYNNIKÓW ALARMOWYCH

- 8) dwójka zapalenia płuc (*Streptococcus pneumoniae*) oporna na cefalosporyny III generacji lub penicylinę;
- 9) ***grzyby Candida odporne na flukonazol lub inne leki z grupy azoli lub kandyn;***
- 10) ***grzyby Aspergillus;***
- 11) rotawirus (rotavirus);
- 12) norowirus (norovirus);
- 13) wirus syncytialny (respiratory syncytial virus);

C.D. Załącznik nr 1 LISTA CZYNNIKÓW ALARMOWYCH

- 14) wirus zapalenia wątroby typu B;
- 15) wirus zapalenia wątroby typu C;
- 16) wirus nabytego niedoboru odporności u ludzi (HIV);
- 17) ***biologiczne czynniki chorobotwórcze izolowane z krwi lub płynu mózgowo-rdzeniowego, odpowiedzialne za uogólnione lub inwazyjne zakażenia.***

DZIĘKUJEMY
za uwagę

