

Osnovni principi tumačenja rezultata mikrobioloških analiza

Klinička mikrobiologija

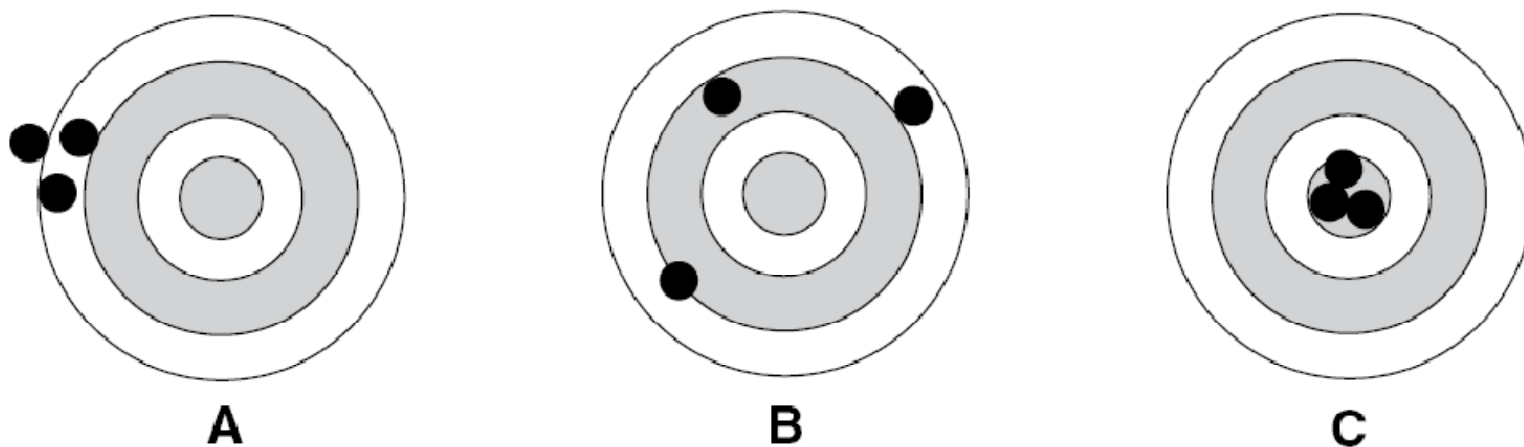
Dijagnostički testovi

- Dijagnostički testovi, kada se pravilno koriste, mogu biti od velike koristi lekaru, kliničaru.
- Dijagnostički testovi su od koristi za:
 - "screening", tj. za identifikaciju faktora rizika bolesti i detekciju okultnih bolesti kod asimptomatskih osoba
 - postavljanje dijagnoze bolesti, tj. da se potvrdi ili isključi prisustvo bolesti kod osoba sa simptomima
 - za zbrinjavanje pacijenata: procenu težine bolesti, prognozu bolesti, praćenje toka bolesti, ponovno pojavljivanje bolesti, izbor lekova za terapiju

Karakteristike dijagnostičkih testova

- **Tačnost** - odgovara pravoj vrednosti.
Neprecizan test je onaj koji ne daje prave vrednosti, čak i ako je test reproducibilan.
Tačnost se postiže kalibracijom opreme sa referentnim materijalom i programom spoljašnje kontrole kvaliteta.
- **Preciznost** je mera reproducibilnosti testa kada se ponovi sa istim uzorkom. Neprecizan test je onaj koji daje različite vrednosti prilikom ponovljenih merenja sa istim uzorkom.

Karakteristike dijagnostičkih testova



Centar mete predstavlja pravu vrednost.

A = Precizan ali netačan test.

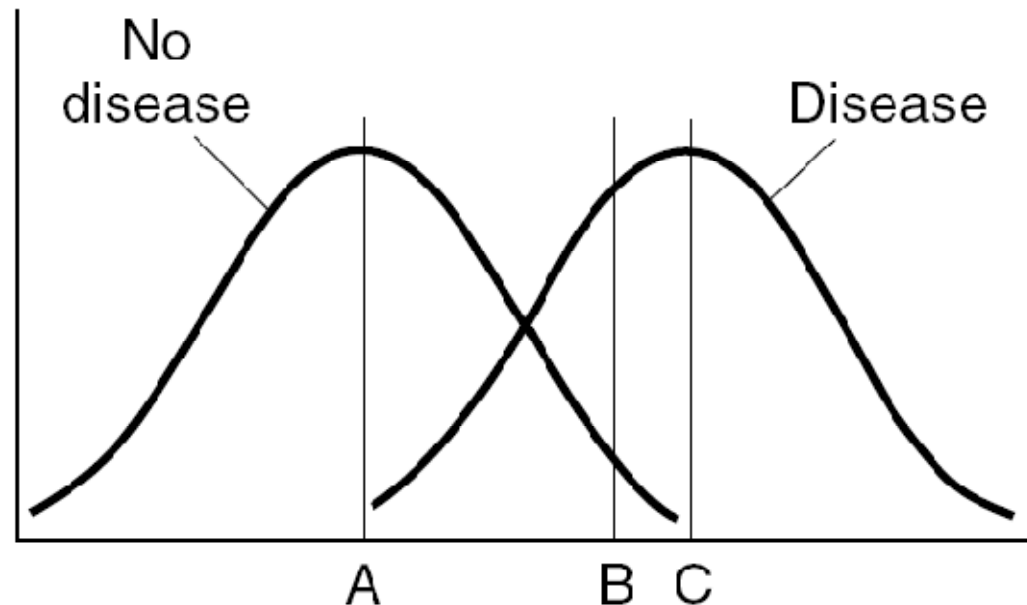
B = Neprecizan i netačan test.

C = Idealan test - precizan i tačan.

Karakteristike dijagnostičkih testova

- **Senzitivnost (osetljivost) testa** je verovatnoća da test bude pozitivan samo kod obolelih pacijenata. Visoko osetljivi testovi su pogodni za isključivanje dijagnoze, zato što će ovakvi testovi dati svega nekoliko **lažno negativnih** rezultata.
- **Specifičnost testa** je verovatnoća da test bude negativan kod zdravih pacijenata. Visoko specifični testovi su pogodni za postavljanje dijagnoze, zato što će ovakvi testovi dati svega nekoliko **lažno pozitivnih** rezultata.
- Da bi se odredila senzitivnost i specifičnost nekog testa za određenu bolest, test mora da se poredi sa "zlatnim standardom".

Karakteristike dijagnostičkih testova



Senzitivnost i specifičnost testa zavise od granične vrednosti koja se koristi:

A = senzitivnost testa 100%; specifičnost niska

C = senzitivnost niska; specifičnost 100%

B = za većinu testova postoji referentni opseg, ± 2 standardne devijacije od srednje vrednosti

Faktori koji utiču na rezultate dijagnostičkih testova

- Brojni spoljašnji (npr. korišćenje lekova) i unutrašnji (npr. neuobičajena fiziološka stanja) faktori mogu uticati na rezultate dijagnostičkih testova.

Faktori koji utiču na rezultate mikrobiološke dijagnostike

1. uzimanje materijala
2. transport materijala
3. obrada materijala:
 - konvencionalna dijagnostika
 - brza dijagnostika
 - molekularna dijagnostika

pravilno tumačenje rezultata

Rezultat mikrobiološke analize

- Rezultat mikrobiološke analize obično sadrži:
 - Podatak o vrsti izolovanog mikroorganizma, rezultatu serologije...
 - Podatak o kvantitiranju*
 - Rezultat antibiograma /antimikograma*
 - Napomene, npr. da nije adekvatan uzorak dostavljen na analizu...*

* ne uvek, zavisno od uzorka i okolnosti

Najčešći problemi koji se sreću pri tumačenju rezultata mikrobioloških analiza

- Konvencionalna mikrobiološka dijagnostika
 - Lažno negativan nalaz
 - Lažno pozitivan nalaz
 - Fiziološka mikroflora
 - Rezultati kvantitiranja mikroorganizama
 - Antibigram / antimikogram
- Serologija
- Molekularne analize

Lažno negativen nalaz

- Lažno negativen nalaz najčešće je posledica:
 - neadekvatno uzetog materijala
 - neadekvatnog transporta materijala
 - nepravilno popunjen zahtev (uput) za analizu
 - problem predstavljaju Brucella, Legionella, Mycoplasma, Mycobacteria i drugi mikroorganizmi koji zahtevaju posebne in vitro uslove za rast i razmnožavanje
 - anaerobni mikroorganizmi predstavljaju dodatni problem

Lažno pozitivan nalaz

- Lažno pozitivan nalaz je najčešće posledica:
 - kontaminacije mikroorganizmima prilikom uzimanja materijala (mikroorganizmima koji predstavljaju deo fiziološke mikroflore ili mikroorganizmima iz okoline)

Fiziološka mikroflora

- Mikroflora se nalazi na koži i sluznicama.
- Mikroflora se sastoji od bakterija, u manjem broju gljiva, i retko od pojedinih vrsta parazita.
- **Virusi nisu deo fiziološke mikroflore (intracelularni paraziti).**
- Fiziološku mikrofloru čine apatogeni i uslovno patogeni mikroorganizmi koji pod posebnim uslovima mogu da izazovu bolest.
- Mikroorganizmi koji su deo fiziološke mikroflore:
 - kontaminanti ili pravi uzročnici bolesti ?
 - znaci i simptomi bolesti; kvantitiranje; ponavljanje analize !
 - problem je što se često ne identifikuju do nivoa vrste !

Kvantitiranje mikroorganizama

- Kvantitiranje mikroorganizama se najčešće radi sa ciljem da se utvrdi da li se radi o infekciji ili kontaminaciji uzorka mikroflorom, ređe proceni toka bolesti i praćenju uspeha terapije (npr. "viral load").
- Kvantitiranje mikroorganizama najčešće se radi za uzorke:
 - urina (kvantitiranje)
 - katetera (kvantitiranje)
 - brisa guše (semikvantitiranje)
 - ređe ostale uzorke u kojima se nalazi fiziološka mikroflora (vaginalni bris, feces za Clostridiae...) (semikvantitiranje ili ređe kvantitiranje)

Antibiogram / antimikogram

- Antibiogram = osetljivost bakterija na antibiotike; antimikogram = osetljivost gljiva na antimikotike.
- Antimikogram se ne radi rutinski, već samo na poseban zahtev.
- Bakterijski izolati se ispituju na standardni set antibiotika, po potrebi, ako se nagalsi, i na druge antibiotike.
- Antibiogram se rutinski ne radi za sve bakterijske izolate iz svih uzoraka.

Antibiogram / antimikogram

- Pojedini mikroorganizmi su urođeno rezistentni na određene antibiotike (npr.: *Enterococcus* spp. je rezistentan na cefalosporine, Gram-negativne bakterije na vankomicin...).
- Lekar kliničar mora biti upoznat sa pojedinim vrstama rezistencije i značajem tih tipova rezistencije za terapiju i epidemiologiju, npr.:
 - **MRSA** (meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*)
 - **VRE** (vankomicin-rezistentni enterokok)
 - **MBL** (metalo- β -laktamaze)
 - **ESBL** (β -laktamaze proširenog spektra delovanja)

Antibiogram / antimikogram

- Nalaz antibiograma ne sme mehanički da se prepisuje na recept (selektivno ili neselektivno izveštavanje antibiograma, poznavanje farmakodinamike i farmakokinetike antibiotika)!!!

Serologija

- Serološke metode se koriste za detekciju mikroorganizama (antigena) kod kojih je kultivisanje teško ili nemoguće.
- Serološke metode se koriste za detekciju antitela (IgM, IgG, retko IgA) - indirektna dijagnostika.
- Detekcija antitela u mnogome zavisi od kvaliteta dijagnostičkog testa koji se koristi (senzitivnost i specifičnost testa).

Serologija

- Za dokazivanje antitela i pravilno tumačenje rezultata dobijenog serološkim testom uzima se jedan ili dva, retko više uzoraka krvi.
- **Jedan uzorak** se obično uzima za detekciju IgM antitela i dijagnozu trenutne bolesti (primarni kontakt sa mikroorganizmom), ili IgG antitela kada dokazujemo prethodnu infekciju ili vakcinaciju.

Serologija

- Generalno, ako se dijagnoza trenutne bolesti postavlja samo na osnovu jednog uzorka, potrebno je detektovati prisustvo i IgM i IgG antitela:
 - ako nema ni IgM ni IgG antitela - najverovatnije nema infekcije
 - ako su prisutna samo IgM antitela ili IgM zajedno sa IgG - verovatno je u pitanju skorašnja infekcija
 - ako su prisutna samo IgG antitela - verovatno je pacijent bio inficiran u prošlosti, ali nema trenutnu infekciju.

Serologija

- Češće se uzimaju 2 uzorka za analizu, u razmaku od 2-3 nedelje (serokonverzija se obično javlja posle 2-3 nedelje, ali kod nekih pacijenata i bolesti i duže).
- Četvorostruki skok titra antitela se smatra dijagnostički značajnim za trenutnu infekciju (važno je oba uzorka testirati u isto vreme, istim dijagnostičkim testom).
- Rezultat se iskazuje kao titar antitela (kvantitativni rezultat).

Serologija

- Posebni problemi:
 - Pojedine infekcije nisu praćene izraženim humoralnim odgovorom.
 - Imunski odgovor nije isti kod svih osoba.
 - Kasna pojava antitela kod nekih bolesti.
 - Perzistentne infekcije.
 - Reinfekcije ili reaktivacije infekcija.

Serologija

- Lažno negativni nalazi:
 - smanjen ili izmenjen imunski odgovor kod imunokompromitovanih osoba
 - lažno negativan nalaz IgM antitela usled kompeticije IgG i IgM antitela za epitop (kod pacijenta sa visokim titrom IgG antitela i relativno niskim titrom IgM antitela)

Serologija

- Lažno pozitivni nalazi:
 - unakrsna reakcija
 - prisustvo reumatoidnog faktora (IgM antitela koja reaguju sa IgG antitelima)
 - primaoci krvi i krvnih produkata...

Molekularne metode

- Molekularne metode još uvek se retko koriste u rutinskoj dijagnostici za:
- Identifikaciju mikroorganizama:
 - koji se ne kultivišu
 - koji se sporo ili “teško” kultivišu
 - u slučaju potrebe za brzim rezultatom
 - u slučaju prednosti nad konvencionalnim i/ili serološkim metodama
- Detekcija specifičnih osobina mikroorganizama
 - npr. toksini, faktori virulencije...
- Tipizaciju mikroorganizama u epidemiološke svrhe (diferencijacija mikroorganizama u okviru iste vrste)

Molekularna dijagnostika

- Obično visoka specifičnost - u pojedinim slučajevima “zlatni standard”, ali senzitivnost varira zavisno od metode.
- Molekularnim metodama uglavnom se dobijaju kvalitativni rezultati (ima / nema), ređe kvantitativni (npr. kvantitiranje nukleinskih kiselina za određivanje “viral load”-a).

Molekularne metode

Molekularne metode "pate od istih bolesti" kao i konvencionalne metode.

Lažno negativni nalazi se javljaju kao posledica:

- Grešaka pri obeležavanju
- Propadanje uzorka tokom transporta/čuvanja/obrade
- Male količine ciljne nukleinske kiseline
- Prisustvo inhibitora
- Neodgovarajući prajmeri/probe
- Mutacija u genima...

Molekularne analize

- **Lažno pozitivni nalazi** se javljaju kao posledica:
 - kontaminacije uzorka prilikom uzimanja ili obrade u laboratoriji
 - grešaka pri obeležavanju
 - odabira neadekvatnih prajmera...

Molekularne analize

- Posebni problemi:
 - detekcija "silent" gena (neaktivnih gena, odsustvo fenotipske ekspresije) - gena koji nisu aktivni zbog mutacija (geni rezistencije na antibiotike, geni koji kodiraju produkciju toksina...)
 - molekularne metode detektuju nukleinske kiseline kako živih tako i mrtvih mikroorganizama

Tumačenje rezultata mikrobioloških analiza

- Pri tumačenju rezultata mikrobioloških analiza uzeti u obzir prisustvo znakova i simptoma bolesti kod pacijenta, istoriju bolesti.
- Konsultovati mikrobiološku laboratoriju.
- Neophodna je saradnja lekara - kliničara i mikrobiologa.