Uzročnici, uzorci i interpretacija bakteriemije

Perše, Gabrijela

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:485405

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Gabrijela Perše

Uzročnici, uzorci i interpretacija bakteriemije

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Gabrijela Perše

Uzročnici, uzorci i interpretacija bakteriemije

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb – Rebro, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, pod vodstvom prof. dr. sc. Ane Budimir i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016./2017.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD 1

2. BAKTERIEMIJA, SEPSA I SEPTIČKI ŠOK 2

2.1. Definicije i kriteriji 2

2.2. Klinički tipovi bakteriemije 5

2.3. Čimbenici rizika za razvoj bakteriemije 6

3. UZROČNICI BAKTERIEMIJE 7

3.1. Escherichia coli 8

3.2 Klebsiella pneumoniae 8

3.3. Pseudomonas aeruginosa 9

3.4 Acinetobacter spp. 9

3.5. Streptococcus pneumoniae 10

3.6. Staphylococcus aureus 11

3.7 Enterococci 11

4. KONVENCIONALNE METODE DETEKCIJE BAKTERIJA U KRVI 12

4.1. Uzorci za hemokulturu 12

4.1.1. Vrijeme uzorkovanja 13

4.1.2. Broj kultura i volumen krvi 13

4.1.3. Mjesto uzorkovanja 14

4.1.4. Postupak prikupljanja uzoraka krvi za hemokulturu 15
4.1.4.1. Dezinfekcijska sredstva 15
4.1.4.2. Dezinfekcija bočica za hemokulturu 16
4.1.4.3. Venepunkcija 16
4.2. Bočice za hemokulturu 16
4.3. Automatizirani uređaji za kontinuirano praćenje hemokultura 18
4.3.1. Tekuće hranjive podloge za hemokulturu 19
4.4. Bakteriološke kulture i biokemijski testovi 19
5. MOLEKULARNE METODE DETEKCIJE BAKTERIJA U KRVI 21
5.1. Prednosti molekularne dijagnoze izravno iz krvi 21
5.2. Nedostaci molekularne dijagnostike izravno iz krvi 22
6. INTERPRETACIJA REZULTATA 23
6.1. Tumačenje pozitivnih hemokultura 23
6.2. Tumačenje rezultata molekularnih metoda 24
7. IZVJEŠTAVANJE REZULTATA 25
7.1. Pozitivan preliminaran rezultat 25
7.2. Pozitivan konačan rezultat 25
7.3. Negativan rezultat 25
8. ZAKLJUČAK 26
9. ZAHVALE 27
10. POPIS LITERATURE 28
11. ŽIVOTOPIS 37

POPIS KRATICA

SIRS - *systemic inflammatory response syndrome* - sindrom sustavnog upalnog odgovora

SOFA - *sequential (sepsis-related) organ failure assessment* - procjena organskog zatajenja induciranog sepsom

JIL - jedinica intenzivnog liječenja

EARS – Net - *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* – Europska mreža za nadzor antimikrobne rezistencije

EU - Europska unija

EEA - *European Economic Area* - Europski gospodarski prostor

AMR - antimikrobna rezistencija

ESBL - *extended-spectrum beta-lactamase* - beta-laktamaza proširenog spektra

CPE - *carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* - karbapenemaza-producirajuće enterobakterije

VAP - *ventilator-associated pneumonia* - pneumonija povezana s mehaničkom ventilacijom

CVK - centralni venski kateter

PCV - *pneumococcal conjugate vaccine* - pneumokokno konjugirano cjepivo

IPB - invazivna pneumokokna bolest

MRSA - *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - Staphylococcus aureus rezistentan na meticilin

VRE - vankomicin - rezistentni enterokoki

ACP - *American College of Physicians* - Američki liječnički zbor

CFU - *colony forming units* - jedinice koje tvore kolonije

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* - institut za kliničke i laboratorijske standarde

IDSA - *Infectious Diseases Society of America* - Američko društvo za infektivne bolesti

PCR - *polymerase chain reaction* - lančana reakcija polimerazom

GC - *genome copies* - kopija genoma

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* - Europski odbor za testiranje antimikrobne osjetljivosti

SAŽETAK

Uzročnici, uzorci i interpretacija bakteriemije

Gabrijela Perše

Općenito govoreći, sufiks „-emija“ (od starogrčkog *αἷμα, haîma*, "krv") (1) odnosi se na prisutnost tvari u krvožilnom sustavu. Tako pojam bakteriemija označava prisutnost bakterija u krvi. Ako je prisutnost praćena umnažanjem bakterija u krvotoku, naziva se septikemija. Upalni odgovor ljudskog organizma na bakteriemiju rezultira sepsom koju obilježava prisutnost kliničkih znakova i simptoma koji mogu progredirati u septički šok. Sepsa je jedan od vodećih uzroka smrtnosti diljem svijeta. Bakteriemija je stoga potencijalno po život opasno stanje koje nosi sa sobom znatan pobol i rizik od smrti. Ne iznenađuje stoga činjenica da brza i točna identifikacija uzročnika bakteriemije i njegove antimikrobne rezistencije predstavlja poseban interes za kliničare. Različiti mikroorganizmi su sposobni uzrokovati bakteriemiju, ali njihova učestalost i distribucija ovisi o čimbenicima kao što je različita zemljopisna lokacija. Praćenje i poznavanje najčešćih uzročnika bakteriemije i njihove rezistencije na antibiotike u svakoj pojedinoj regiji može pomoći u odabiru najučinkovitije empirijske terapije za pacijente s bakteriemijom. S druge strane, odabir ciljane antimikrobne terapije za liječenje bakteriemije zahtijeva mikrobiološku obradu. Uzimanje krvi za hemokulturu nakon koje slijedi izrada antibiograma još uvijek se smatra zlatnim standardom za određivanje etiologije bakteriemije i njene terapije. Ovaj pregledni rad će se usredotočiti na kliničku važnost konvencionalnih tehnika hemokulture te dijagnostičke strategije za otkrivanje bakteremije, uključujući i pregled novih molekularnih metoda i pristupa. S obzirom na važnost koju imaju u dijagnostici bakteriemije, važno je razumjeti načela, tehničke zahtjeve i ograničenja ovih metoda.

ključne riječi: bakteriemija, sepsa, antimikrobna rezistencija, hemokultura, antibiogram

SUMMARY

Causative agents, samples and interpretation of bacteremia

Gabrijela Perše

Generally speaking, the suffix "-emia" (from ancient Greek *αἷμα, haîm*, "blood") (1) refers to the presence of different substances in the bloodstream. Thus, the term bacteremia represents the presence of bacteria in the blood. If the presence is accompanied by bacterial multiplication in the bloodstream, it is called septicemia. The inflammatory response of the human organism to bacteremia results in sepsis, a condition characterized by the presence of clinical signs and symptoms that may progress to septic shock. Sepsis is one of the leading causes of death worldwide. Bacteremia is therefore a potentially life-threatening condition that carries with it a considerable morbidity and the risk of death. It comes as no surprise that the rapid and accurate identification of causative agents and their antimicrobial resistance is of particular interest to clinicians. Different microorganisms are capable of causing bacteremia, but their frequency and distribution depends on factors such as different geographic location. Monitoring and being informed about the most common causative agents and their antimicrobial resistance in each region can help in selecting the most effective empirical therapy for patients with bacteremia. On the other hand, selection of targeted antimicrobial therapy for the treatment of bacteremia requires microbiological processing. Blood culture processing followed by antibiogram making is still a method of choice for determining the etiology of bacteremia and its therapy. This review will focus on the clinical importance of blood cultures; diagnostic strategies for the detection of bacteremia, including a review of new molecular methods and approaches. Considering the importance of these methods in diagnosis of bacteremia, it is important to understand their principles, technical requirements and limitations.

key words: bacteremia, sepsis, antimicrobial resistance, blood cultures, antibiogram

1. UVOD

Bakteriemija, sepsa i njihove posljedice predstavljaju velik javnozdravstveni problem. Sepsa je jedan od vodećih uzroka smrti diljem svijeta, a pacijenti koji i uspiju preživjeti septičnu epizodu često imaju dugotrajne tjelesne, psihološke i kognitivne poteškoće. Za uspješnu borbu protiv bakteriemije i njenih posljedica ključna je učinkovita antibiotska terapija. Odluku o odabiru najprikladnije empirijske terapije donosi kliničar, a ona se temelji na poznavanju učestalosti određenih infektivnih procesa, njihovih uzročnika te stanja lokalne antimikrobne rezistencije. S druge strane, odluka o ciljanoj antibiotskoj terapiji temelji se na mikrobiološkoj identifikaciji etiološkog patogena, što je najvažniji zadatak kliničke mikrobiologije. Najtraženija pretraga u kliničkom mikrobiološkom laboratoriju je hemokultura. Postupak započinje prikupljanjem uzoraka krvi, primjenjujući tehniku kojom se nastoji spriječiti kontaminacija uzoraka i povećati osjetljivost pretrage. To podrazumijeva pravilnu dezinfekciju kože i prikladno rukovanje uzorcima, prikupljanje adekvatnog broja uzoraka i, što je najvažnije, adekvatne količine krvi. Hemokulture se zatim inkubiraju u različitim hraništima, a rast mikroorganizama se prati pomoću automatiziranih uređaja. Mikroorganizmi se identificiraju Gram bojenjem i biokemijskim testovima nakon čega slijedi i izrada antibiograma koji daje nezamjenjive podatke o antimikrobnoj rezistenciji patogena. Uzimanje hemokulture nakon koje slijedi izrada antibiograma još uvijek se smatra zlatnim standardom za određivanje etiologije bakteriemije i njene terapije. Međutim, današnji tehnološki napredak doveo je do sve veće primjene molekularnih metoda koje upotpunjuju konvencionalne hemokulture, a prednost im je velika brzina i osjetljivost. Bez obzira na to primjenjuje li se konvencionalna ili molekularna tehnika za izolaciju patogena, potrebno je veliko znanje, iskustvo i bliska suradnja između laboratorija i kliničara kako bi se dobiveni laboratorijski nalaz mogao ispravno interpretirati u kontekstu pacijentove kliničke slike.

2. BAKTERIEMIJA, SEPSA I SEPTIČKI ŠOK

2.1. Definicije i kriteriji

Bakteriemija je prisutnost živih mikroorganizama – bakterija u krvotoku. Krv je primarno sterilna tjelesna tekućina, stoga je dokaz bakterija u krvi uvijek patološki nalaz. Za razliku od pojma bakteriemija koja jednostavno identificira prisutnost bakterija u krvi, sepsa označava sindrom sustavnog upalnog odgovora (SIRS) koji je, u slučaju bakteriemije, prouzročen infekcijom koja može, ali ne mora biti dokazana (2). SIRS je odgovor ljudskog organizma na različite teške nokse, a definira se prisutnošću 2 ili više sljedećih kriterija:

- tjelesna temperatura >38 °C ili <36 °C,

- srčana frekvencija >90/min,

- frekvencija disanja >20/min ili $PaCO_2 < 4{,}27$ kPa

- broj leukocita > 12 x 10^9/L ili < 4 x 10^9/L ili prisutnostr nezrelih oblika leukocita >10% (3).

U veljači 2016.godine objavljeni su rezultati treće konsenzus konferencije na kojoj je izvršena revizija postojećih definicija i kliničkih kriterija sepse, teške sepse i septičkog šoka. Prema radnoj skupini stručnjaka koji su radili na dotičnom konsenzusu, SIRS kriteriji koji su trenutno u uporabi za potvrdu dijagnoze sepse nisu od pomoći jer mogu biti prisutni i u mnogih hospitaliziranih pacijenata koji nikad ne razviju infekciju (slaba diskriminirajuća vrijednost) (4). Tako SIRS mogu uzrokovati različita stanja, kao što su teška trauma, kirurški zahvati i/ili njihove komplikacije, adrenalna insuficijencija, plućna embolija, akutni pankreatitis, infarkt miokarda, anafilaksija, opekline i mnogi drugi (5). S druge strane, mnogi pacijenti primljeni u bolnicu sa sumnjom na sepsu i novonastalo zatajenje organa ne zadovoljavaju minimum od 2 SIRS kriterija za dijagnozu sepse, a ipak su imali dugotrajne epizode sa značajnom stopom morbiditeta i smrtnosti (6). Primjerice, nemaju svi bolesnici povišenu temperaturu; novorođenčad, stariji bolesnici, imunodeficijentni bolesnici, kao i oni na

imunomodulirajućoj terapiji (kortikosteroidi, citostatici, monoklonska protutijela i slično) ne mogu uspostaviti odgovarajući febrilni odgovor na infekciju. Dakle, budući da SIRS kriteriji nisu pokazali zadovoljavajuću osjetljivost niti specifičnost za dijagnozu sepse, nove definicije i kriteriji bili su prijeko potrebni. Prema novim preporukama, sepsa se definira kao životno ugrožavajuća disfunkcija organa uzrokovana nereguliranim odgovorom domaćina na infekciju (7). Organska disfunkcija može se definirati kao promjena u ukupnom zbroju vrijednosti pojedinih parametara tzv. SOFA vrijednosnog sustava (tablica 1) za ≥ 2 u prisutnosti infekcije (7). Postoje i modificirani qSOFA kriteriji (engl. *Quick SOFA*) za brzu procjenu i prognozu pacijenata sa sumnjom na infekciju.

qSOFA kriteriji uključuju barem 2 od navedena 3 kriterija:

- promjena stanja svijesti (GCS $\leq$ 13),
- sistolički krvi tlak $\leq$ 100 mm Hg
- frekvencija disanja $\geq$ 22/min (7).

Budući da nova definicija sepse danas podrazumijeva ono što se nekoć smatralo teškom sepsom, radna skupina je zaključila da je pojam 'teška sepsa' postao suvišan (7). Septički šok se definira kao perzistirajuća hipotenzija prouzročena sepsom koja zahtijeva inotropnu potporu za održavanje srednjeg arterijskog tlaka $\geq$ 65mmHg u kombinaciji s razinom laktata u serumu > 2 mmol / L (18 mg / dL) unatoč adekvatnoj nadoknadi volumena tekućinom (7).

Tablica 1. SOFA bodovanje[a]

	Bodovi				
Sustav	0	1	2	3	4
dišni $Pa0_2/FIO_2$, mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) s respiratornom potporom	<100 (13.3) s respiratornom potporom
hematološki trombociti, $x10^3/\mu L$	≥150	<150	<100	<50	<20
jetreni bilirubin u serumu, mg/dL (µmol/L)	<1.2 (20)	1.2 – 1.9 (20 -32)	2.0 – 5.9 (33 – 101)	6.0 – 11.9 (102 – 204)	> 12 (204)
kardiološki srednji arterijski tlak (mm Hg)	≥ 70	< 70	dopamin < 5 (µg/kg/min) ili dobutamin (bilo koja doza)	dopamin 5.1 – 15 (µg/ kg/min) ili epinefrin ≤0.1 (µg/ kg/min) ili norepinefrin ≤0.1 (µg/ kg/min)	dopamin >15 (µg/ kg/min) ili epinefrin >0.1 (µg/ kg/min) ili norepinefrin >0.1(µg/ kg/min)
neurološki Glasgow Coma Score	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	<6
bubrežni kreatinin, mg/dL, (µmol/L) ili diureza (mL/dan)	<1.2 (110)	1.2 – 1.9 (110 – 170)	2.0 – 3.4 (171 – 299)	3.5 – 4.9 (300 – 440) ili <500	>5.0 (440) ili <200

[a]*prilagođeno prema Vincent i sur.(9)*

2.2. Klinički tipovi bakteriemije

Postoji nekoliko podjela bakteriemije. Prema duljini trajanja bakteriemijske epizode, razlikujemo tranzitorne (prolazne), intermitentne (povremene) i perzistentne (kontinuirane) bakteriemije (8). Tranzitorna bakteriemija je kratak, samoograničavajući i najčešći oblik bakteriemije. Javlja se kada mikroorganizmi, u većini slučajeva pripadnici fiziološke flore, dospiju u krv tijekom nehotične traume koja uključuje kontaminirane ili kolonizirane mukozne membrane kao, primjerice, tijekom silovitog pranja zubi, naprezanja tijekom defekacije ili tijekom medicinskih postupaka (npr. dentalni zahvati, cistoskopija i gastrointestinalna endoskopija) (8). Intermitentna bakteriemija događa se kao komplikacija infekcije, kada se bakterije s inficiranog sijela periodički otpuštaju u krv (8). Izvor infekcije može biti bilo koja lokalizirana upala. Ipak, najčešće se javlja kod intraabdominalnih apscesa, celulitisa te nedreniranih upala zatvorenih tjelesnih prostora poput empijema, peritonitisa ili septičkog artritisa. Kontinuirana bakteriemija označava prisutnost infektivnog žarišta unutar vaskularnog sustava (infektivni endokarditis, supurativni tromboflebitis i slično). Ona također može nastati diseminacijom bakterija iz lokaliziranog žarišta, ali najčešće nastaje izravnim ulazom patogena u krvotok putem stranog materijala, primjerice kontaminiranog pribora u intravenskih korisnika droge. Unatoč najboljim naporima kliničara, izvor bakteremije ostaje nepoznat u čak trećine slučajeva (8,10). Takve slučajeve onda definiramo kao primarnu bakteriemiju. S druge strane, kada postoji uočljivo žarište infekcije u nekom tkivu ili organskom sustavu, govorimo o sekundarnoj bakteriemiji. Primarno ili sekundarno nastala bakteriemija može dovesti do diseminacije infekcije putem krvi do udaljenih organa i ondje stvoriti novo infektivno žarište. Tada govorimo o 'metastatskoj infekciji' (8). Još jedna podjela bakteriemije na bolničku (engl. hospital - acquired) i izvanbolničku (engl. community-acquired) bakteriemiju ovisi o okolini u kojoj se pojedinac zarazio. Bolnička bakteriemija definira se kao ona koja se pojavi 48 sati nakon hospitalizacije pacijenta u kojega prilikom prijema nije bilo znakova infekcije (11). Ovo je bitno jer raspodjela uzročnika varira između bolničkih i izvanbolničkih infekcija, kao i između različitih kliničkih specijalnosti (12).

2.3. Čimbenici rizika za razvoj bakteriemije

Iako je poznato da gotovo sve lokalizirane infekcije mogu diseminirati u krvotok, vjerojatnost bakteriemije nije ista za sve infektivne procese. Stanja u kojima se ne očekuje prisutnost bakteriemije uključuju blage infekcije gornjih dišnih puteva, donjeg dijela mokraćnog sustava i pacijente s izvanbolničkom pneumonijom. Bakteriemija je srednje vjerojatna u bolesnika s urološkim bolestima, i to prvenstveno onih s akutnim pijelonefritisom. Vjerojatnost bakteriemije vrlo je visoka u bolesnika sa sepsom, septičkim šokom ili akutnim bakterijskim meningitisom (13). Čimbenici koji predisponiraju razvoju bakteriemije i njenih komplikacija uključuju dob, komorbiditete, imunosupresivna stanja, terapijske zahvate i klinički odjel na kojem se bolesnik liječi. Popis bolesti s kojima je povezan povećan rizik od bakteriemije poprilično je dugačak, a uključuje hematološke i nehematološke malignome, metaboličke bolesti, zatajenje bubrega koje zahtijeva dijalizu, cirozu jetre, sindrome imunodeficijencije te stanja povezana s gubitkom normalnih kožnih barijera poput ozbiljnih opeklina i dekubitusa (10). Terapijske mjere koje nose opasnost od bakteriemije uključuju prisutnost stranih materijala poput intravaskularnih katetera te sve vrste kirurških i endoskopskih zahvata, posebno probavnog i mokraćnog trakta. Jedinice intenzivnog liječenja (JIL) na prvom su mjestu prema incidenciji bolničke bakteriemije (51% slučajeva) (14, 15), a razlog vjerojatno leži u učestaloj i dugoročnoj primjeni centralnih i perifernih venskih pristupa za primjenu terapije i parenteralne prehrane. Nakon JIL-a prema rangu slijedi odjel interne medicine (38%), kirurški odjeli (20%) i odjel pedijatrije (13.5%) (14,15).

3. UZROČNICI BAKTERIEMIJE

Europske studije ukazuju na to da od svih bakterija koje uzrokuju bakteriemiju, 44-48% su Gram-negativni, a 44-49% Gram-pozitivni mikroorganizmi (12,16). Uloga Gram-negativnih bakterija u etiologiji bakteriemije je u porastu, osobito u bolničkim infekcijama. Empirijska antimikrobna terapija često nije zadovoljavajuća zbog sve učestalije bakterijske rezistencije. Prema godišnjem izvješću europske mreže za nadzor antimikrobne rezistencije (EARS-Net), sedam mikroorganizama i njihova rastuća antimikrobna rezistencija predstavlja veliki značaj za zdravstvo u Europi (17). To su sljedeće bakterije: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* i Enterococci. Dotično izvješće prikazuje analizu podataka o antimikrobnoj rezistenciji invazivnih izolata (iz krvi i cerebrospinalne tekućine) koje je prikupilo i podnijelo 30 zemalja EU / EEA, a podaci se odnose na 2015.

Antimikrobna rezistencija (AMR) je sposobnost mikroorganizma da se odupre djelovanju jednog ili više antimikrobnih lijekova (17). AMR ovisi o vrsti bakterije, mehanizmu djelovanja antibiotika i geografskoj regiji. Primjerice, manji postotak rezistencije prijavile su zemlje na sjeveru, a veći postotak zemlje na jugu i istoku Europe (17). Iz toga jasno proizlazi da na rezistenciju mikroorganizama utječe i ljudski faktor. On se očituje u različitoj praksi propisivanja antibiotika te različitih nacionalnih smjernica za prevenciju i kontrolu infekcije.

Razvoj AMR događa se spontano, selektivnom mutacijom u kromosomu bakterije i/ili horizontalnim prijenosom genetičkog materijala putem plazmida. Bakterija može posjedovati nekoliko različitih mehanizama rezistencije. Osnovni uzroci širenja AMR su prekomjerno nekritično propisivanje antibiotika, nedosljedno provođenje terapije te prijenos rezistentnih mikroorganizama između ljudi; između životinja; između ljudi, životinja i okoliša (17). Osim toga, današnja prometna povezanost i velika mobilnost ljudi također ide u prilog širenju rezistentnih bakterija. Prema Townsu i sur., čak 20-30% septičnih bolesnika prima neprimjerenu empirijsku terapiju (18). Za invazivne bakterijske infekcije, brzo i učinkovito liječenje antibioticima najvažniji je čimbenik za smanjenje rizika od lošeg ishoda.

3.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli je gram-negativna štapićasta bakterija koja pripada velikoj, raznolikoj porodici Enterobacteriaceae. Dio je raznovrsne fiziološke mikroflore probavnog sustava čovjeka, ali i učestali uzročnik bakterijskih infekcija: infekcija urinarnog trakta, bakteriemija, putničkih dijareja i neonatalnog meningitisa (19). Prema službenim podacima, *E.coli* je najčešći uzrok bakteriemije i infekcija mokraćnog sustava u Europi (17).

Rezistencija *E.coli* na beta-laktamske antibiotike uglavnom je posljedica proizvodnje enzima beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) koji se prenosi plazmidnim genima. Najveći postotak rezistencije postoji za aminopeniciline (57.2%), a zatim fluorokinolone (22,8%) (17).

To dovodi do povećane primjene karbapenema u borbi protiv *E.coli* što potiče selekciju karbapenemaza-producirajućih enterobakterija (CPE). Karbapenemaze su skupina enzima koji mogu hidrolizirati većinu beta-laktama, uključujući karbapeneme. Srećom, rezistencija na karbapeneme u *E. coli* je trenutno rijetkost u Europi, <0,1% prijavljenih rezistentnih izolata u većini zemalja (20).

3.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, još jedna bakterija iz porodice Enterobacteriaceae, pretežito kolonizira hospitalizirane pojedince te uzrokuje bolničke infekcije. Infekcije najčešće zahvaćaju mokraćni sustav, donji respiratorni sustav i krvotok. Za razliku od *E. coli*, *K. pneumoniae* ima kromosomski kodirane beta-laktamaze i stoga je intrizički rezistentna na aminopenicilin (17). Rezistencija na karbapeneme koja je u stalnom porastu, naročito je visoka u *K. pneumoniae*. Najveće stope zabilježene su u mediteranskim i balkanskim zemljama, a tri zemlje s najvećim udjelom su Grčka, Italija i Rumunjska (61.9 %, 33.5 % i 24.7 %) (17). Infekcije koje uzrokuje *Klebsiella* uzrok su visokih troškova u zdravstvu, prolongiranog boravka u bolnici i neuspjeha liječenja.

3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je nefermentirajuća gram-negativna bakterija. Oportunistički je patogen pa su na njega slabije otporni bolesnici s oštećenjem imunološkog sustava. Infekcije koje najčešće izaziva su upale pluća, uključujući pneumonije povezane s mehaničkom ventilacijom (VAP), bakteriemije te infekcije mokraćnog sustava (17). Ubikvitarnost *Pseudomonasa* u bolnicama i drugim zdravstvenim ustanovama je teško kontrolirati jer je intrizički neosjetljiv na mnoge dezinficijense i antimikrobne spojeve. Uočen je trend smanjenja rezistencije na fluorokinolone i aminoglikozide kao i povećanje rezistencije na kombinaciju piperacilin/tazobaktam u *P. Aeruginosa* tijekom 2015.godine (17).

3.4. *Acinetobacter* spp.

Rod Acinetobacter sastoji se od velikog broja vrsta. To su pretežito gram-negativni, strogo aerobni, oportunistički patogeni. Točna identifikacija izolata Acinetobactera na razinu vrste nije nimalo jednostavna i predstavlja pravi izazov za mikrobiologe. Klinički najvažniji predstavnici roda su vrste koje pripadaju skupini A.baumanii, a to su *A. baumannii*, *A. pittii* i *A. nosocomialis* (17). A. baumannii skupina uzročnika gotovo isključivo uzrokuje infekcije u hospitaliziranih ljudi i to bolničke pneumonije (osobito VAP), CVK bakteriemije, infekcije mokraćnog sustava, infekcije kirurških i drugih rana. Skupina A. baumannii ima nisku patogenost i mali potencijal za invaziju u imunokompetentnih osoba. Zbog toga infekcije ovom bakterijom pogađaju kronične bolesnike i one oslabljenog imuniteta. Dugo preživljava u suhom okolišu te se lako širi po bolničkim odjelima, posebice u jedinicama intenzivnog liječenja. Rizici za stjecanje višestruke rezistencije na lijekove A. baumannii skupine uključuju sve radnje koje se poduzimaju u svrhu terapije i potpore pacijenata. To su produljena mehanička ventilaciju, dugotrajna hospitalizacija, učestale i invazivne intervencije te primjena antibiotika širokog spektra, posebno treće generacije cefalosporina, fluorokinolona i karbapenema (17).
Rezistencija na karbapeneme učestala je u *Acinetobacter* spp. i u većini slučajeva kombinirana s

rezistencijom na fluorokinolone i aminoglikozide (17). Istraživanja pokazuju da karbapenem-rezistentni *Acinetobacter* spp. više diseminiran po Europi nego CPE (21).

3.5. Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae, gram-pozitivan diplokok, najučestaliji je uzročnik upale pluća, ali uzrokuje i niz drugih kliničkih entiteta poput sinusitisa, upale srednjeg uha, meningitisa i bakteriemije. Pneumokokne infekcije zahvaćaju ljude svih životnih dobi,ali najviša je incidencija u dojenčadi i male djece te starijih osoba. Osim dobi, stanja koja predisponiraju nastanku invazivne pneumokokne bolesti su splenektomija, srpasta anemija, kronične bolesti srca i pluća te stanja prirođene ili stečene nemogućnosti stvaranja protutijela (agamaglobulinemija, hipogamaglubulinemija) i mnoge druge (19). Najvažniji čimbenik patogenosti i invazivnosti pneumokoka je polisaharidna kapsula koja štiti bakteriju od fagocitoze. Poznato je više od 90 različitih kapsularnih serotipova, koji se razlikuju prema virulenciji, prevalenciji i rezistenciji na lijekove (17). Većina pneumokoknih bakteriemija u odraslih osoba nastaje u tijeku pneumonije, ali se smatra da se to događa u samo 25% slučajeva pneumonije (19). Pneumokok pokazuje rezistenciju na penicilin koja u Europi iznosi 10 do 25%, a u Hrvatskoj oko 30%, što je malo iznad europskog prosjeka (19). Većina država članica EU / EEA provodi rutinsko cijepljenje za djecu polivalentnim pneumokoknim konjugiranim cjepivom (PCV) te u nekim slučajevima i imunizaciju polisaharidnim cjepivom za odrasle visokorizične skupine, kao što su starije osobe i imunokompromitirani (22). Najviše stope invazivne pneumokokne bolesti (IPB) događaju se upravo među djecom do dvije godine starosti i među starijima od 65 godina. Ovaj podatak je jedinstven znanstveni dokaz da ove dobne skupine treba uključiti u rutinski program cijepljenja.

3.6. Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus je široko rasprostranjena gram-pozitivna bakterija koja često prolazno ili trajno kolonizira kožu zdravih ljudi. *S. aureus* je stoga oportunistički patogen koji može uzrokovati raznolike kliničke slike, od benignih infekcija kože do bakteriemije sa septičkim ishodom. Stafilokokne bakteriemije i danas su težak problem zbog sve većeg broja invazivnih pretraga i operativnih zahvata, posebno onih pri kojima se implantiraju strani materijali u ljudski organizam. *Staphylococcus aureus* rezistentan na meticilin (MRSA) oduvijek je bio glavni bolnički patogen, premda se danas bilježi trend pada rezistencije (17). Neovisno o bolničkom soju, javljaju se i izvanbolnički MRSA sojevi u mnogim dijelovima svijeta, uključujući i Europu. Velika incidencija MRSA-e pridonosi produženom boravku u bolnici i većoj smrtnosti zbog odgođenog početka prikladne terapije. *S. aureus* stječe rezistenciju na meticilin i sve ostale beta-laktame eksprimiranjem mecA gena, koji se nalazi na kromosomu. Noviji mec gen, mecC (prethodno zvan mecALGA251), opisan je 2010.godine (17). Rezistencija MRSA- e na trimetoprim-sulfametoksazol i ostale lijekove djelotvorne protiv MRSA infekcija (glikopeptide, oksazolidinone, daptomicin, tigeciklin) i dalje je rijetkost (17).

3.7 Enterococci

Enterokoki se smatraju bezopasnim komenzalima gastrointestinalnog sustava. Oni svojim kompetitivnim učinkom štite čovjeka od naseljavanja patogenih crijevnih mikroorganizama. No kada je zajednički odnos s domaćinom poremećen, kao na primjer kod traume ili oštećenja imunološkog sustava, a ti mikroorganizmi uđu u primarno sterilne prostore (trbušna šupljina ili krv), mogu uzrokovati veoma teške infekcije, uključujući endokarditis, bakteriemiju, peritonitis i intraabdominalne apscese. Veliku većinu kliničkih enterokoknih infekcija u ljudi uzrokuju *E. faecalis* i *E. faecium* (17). Enterokoki pokazuju značajnu rezistenciju na glikopeptide, posebice vankomicin. Dva su genotipa klinički važna: vanA, s visokom razinom rezistencije na vankomicin i teikoplanin; i

vanB, s varijabilnom rezistencijom samo na vankomicin. Najznačajniji vankomicin-rezistentni enterokoki (VRE) su upravo *E. faecalis* i *E. Faecium.*

4. KONVENCIONALNE METODE DETEKCIJE BAKTERIJA U KRVI

Dokaz i identifikacija uzročnika bakteriemije jedna je od najvažnijih djelatnosti kliničkog mikrobiološkog laboratorija, a hemokultura se smatra zlatnim standardom za dijagnozu infekcija krvi. Tek nešto više od trećine pacijenata sa sepsom ima pozitivne hemokulture (18). Niska stopa pozitivnih hemokultura može biti posljedica nedovoljne osjetljivosti dijagnostičke metode ili je posljedica fiziologije samog infektivnog procesa (lokaliziranost infekcije). Osjetljivost hemokulture ovisi o prikupljanju odgovarajućih uzoraka krvi koji ovise o pravilnoj dezinfekciji kože, prikupljanju adekvatnog broja uzoraka i dovoljne količine krvi te pravilnom rukovanju s uzorcima.

4.1. Uzorci za hemokulturu

Uzorak za hemokulturu je venska krv. Uzimanje i pretraga uzoraka krvi iz arterije neće povećati stopu izolacije mikroorganizama iz krvi (24, 25). Prema smjernicama američkog liječničkog zbora nije preporučljivo uzimati uzorak krvi iz intravenskog katetera jer tako dobiveni uzorci pokazuju povećanu učestalost kontaminacije i lažno pozitivnih rezultata (24).

4.1.1. Vrijeme uzorkovanja

Uzorci krvi za hemokulturu uzimaju se kada je to klinički opravdano te postoji izričita sumnja na invazivan proces. Stanja u kojima su hemokulture posebno važne uključuju dokazanu ili pretpostavljenu sepsu, meningitis, osteomijelitis, artritis, endokarditis, peritonitis, upalu pluća i vrućicu nepoznatog podrijetla (25). Preporuča se uzimanje uzorka krvi za hemokulturu neposredno nakon porasta tjelesne temperature i pojave simptoma zimice i tresavice, iako je prema recentnim studijama dokazano da vrućica u vrijeme prikupljanja hemokulture nije specifična za bakteriemiju. U retrospektivnoj studiji Riedela i suradnika u više od 1.400 bolesnika s bakteriemijom, dokazano je da prikupljanja hemokultura za vrijeme porasta temperature ne povećava stopu pozitivnih hemokultura (26). Stoga se preporuča da uzimanje višebrojnih setova hemokulture bude istodobno ili tijekom kratkog vremenskog perioda (mjerenog u minutama) umjesto u nekoliko navrata. Nedvojbeno je bolje uzeti uzorak krvi za hemokulturu prije početka empirijskog antimikrobnog liječenja (18,23). Ukoliko je pacijent već primio antibiotsku terapiju, tada se uzorak krvi uzima neposredno prije slijedeće doze antibiotika pod pretpostavkom da je tada koncentracija antibiotika u serumu najniža.

4.1.2. Broj kultura i volumen krvi

Kultiviranje odgovarajućeg volumena krvi je najvažniji pojedinačni faktor koji određuje stopu izolacije bakterija iz krvi, osobito kod odraslih. Razlog leži u tome što većina odraslih s bakteriemijom ima niske koncentracije cirkulirajućih mikroorganizama u krvi. Čak 50% pacijenata ima <1,0 CFU (od engl.*colony forming units*) po mililitru krvi (18). Svaki dodatni mililitar krvi, povećava stopu izolacije za 3% (27). Broj mikroorganizama prisutnih po mililitru krvi u dojenčadi i djece obično je veći od 100 CFU / mL krvi, stoga je u pedijatrijskih pacijenata volumen krvi od manje presudne važnosti za pozitivitet hemokulture. Jedan set hemokulture sadrži parne bočice; jedna bočica za aerobne i jedna bočica za anaerobne bakterije. Istraživanja Washingtona (28) te Weinsteina i sur. (29)

pokazala su da se više od 95% epizoda bakteriemije otkrije pomoću dva do tri seta hemokulture. Samo jedan set hemokulture neće osigurati dovoljan volumen krvi i možda neće uspjeti detektirati bakteriemiju ukoliko je ona intermitentnog karaktera. Uostalom, udio pozitivnih hemokultura ključan je za tumačenje kliničkog značaja određenih izoliranih mikroorganizama jer pomaže liječnicima razlikovati kontaminaciju od pravih patogena. S druge strane, uzimanje više od 3 seta hemokultura ne donosi puno dodatnih informacija, odnosno ne pomože razlikovati klinički važne od kontaminirajućih izolata. Čak štoviše, ono je financijski neisplativo, iziskuje puno posla, a u pacijenata može inducirati anemiju (10).

Preporučeni volumen krvi:

- odrasli: 8-10 ml po jednoj bočici (ukupno 20 ml po jednom setu)
- novorođenčad i djeca: 1-3 ml po bočici (30).

Kao što je već spomenuto, u novorođenčadi i djece pozitivitet hemokulture manje ovisi o količini uzorka krvi nego kod odraslih, a računa se prema tjelesnoj masi djeteta i važno je da ne bude veći od 1% ukupnog djetetova volumena (25, 31, 32).

4.1.3. Mjesto uzorkovanja

Svaki se set uzima s različitog mjesta venepunkcije. S obzirom da je bakteriemija najčešće intermitentnog karaktera (25), preporučeno je uzeti setove tijekom vremenskog perioda od najmanje 10-ak minuta. Kod sumnje na CVK-bakteriemiju (bakteriemija sa ishodištem u centralnom venskom kateteru) potrebno je uzeti jedan set hemokultura sa perifernog mjesta venepunkcije, a drugi set hemokulture iz centralnog venskog pristupa. Prema smjernicama instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI) i preporukama Američkog društva za infektivne bolesti (IDSA) ovakvo uzorkovanje pomaže pri određivanju je li kateter uistinu izvor infekcije. Ako je kateter doista izvor infekcije, bit će više CFU-a po mL krvi dobivene iz katetera i rezultat će biti pozitivan 90 - 120 minuta ranije od hemokulture uzete perifernom venepunkcijom (18). Ukoliko ne postoji sumnja na CVK-bakteriemiju,

ne preporuča se uzimanje uzoraka krvi iz postojećeg intravaskularnog katetera jer je dokazano veći postotak kontaminacije uzorka.

4.1.4. Postupak prikupljanja uzoraka krvi za hemokulturu

Jedan od važnih čimbenika koji povećavaju osjetljivost hemokulture u otkrivanju bakteriemije je tehnika uzimanja uzoraka krvi, uključujući dezinfekciju kože po pravilima asepse te pravilno vađenje krvi venepunkcijom. Bilo da krv prikupljaju medicinski tehničari, medicinske sestre ili drugi pružatelji zdravstvene skrbi, potrebne su jedinstvene smjernice i pravila za adekvatno uzorkovanje.

4.1.4.1. Dezinfekcijska sredstva

Objavljena su brojna izvješća koja uspoređuju relativnu učinkovitost raznih dezinficijensa (33 - 35). Iako su komercijalno dostupni pripravci povidon joda jeftini i jednostavni za upotrebu, trenutne smjernice tvrde da su tinktura joda i klorheksidin glukonat učinkovitiji dezinficijensi. Istraživanje provedeno na više od 3800 uzoraka hemokultura dobivenih od odraslih pacijenata pokazalo je nižu stopu kontaminacije s jodnom tinkturom u usporedbi s povidon jodom (2,4 prema 3,8 %) (33). Slično istraživanje koje uspoređuje klorheksidin s povidon jodom pri kojem je obrađeno više od 2000 hemokultura pokazalo je nižu stopu kontaminacije s klorheksidinom (1,4 prema 3,4 %) (35). Štoviše, pripravci povidon joda se ne preporučuju i iz razloga što se moraju primjenjivati 1,5 do 2 minute da budu učinkoviti te zdravstveno osoblje nije sklono čekati ovoliko dugo (36). Preporuka je da se mjesto venepunkcije očisti sa 70 %-tnim alkoholom, a zatim 2 %-tnom tinkturom joda ili klorheksidinom (25).

4.1.4.2. Dezinfekcija bočica za hemokulturu

Nakon što se uklone plastični poklopci od bočica za hemokulturu, gumeni pokrov treba očistiti prebrisavanjem dezinfekcijskim sredstvom te ostaviti dok primijenjeno sredstvo ne ishlapi u potpunosti. Alkohol bi se trebao koristiti za dezinficiranje gumenih čepova na bočicama za hemokulture (25). Jod se kao sredstvo ne smije koristiti u tu svrhu jer, prema proizvođačima, može uzrokovati propadanje gumenog materijala (10, 30).

4.1.4.3. Venepunkcija

Prije početka venepunkcije, potrebno je pripremiti i provjeriti sav potreban materijal. Nakon uobičajene higijene ruku zdravstvenog djelatnika, slijedi higijena odabranog mjesta za venepunkciju. Vidljivo onečišćena mjesta na koži pacijenta predviđena za venepunkciju potrebno je oprati vodom i sapunom. Potom se stavlja poveska i palpira se vena. Mjesto venepunkcije treba dezinficirati odgovarajućim antiseptičkim sredstvom te pričekati da primjenjeno sredstvo u potpunosti ishlapi i koža bude suha. Nakon dezinfekcije kože, mjesto uboda se više ne smije palpirati, osim ako se ne koriste sterilne rukavice (10, 37). Nakon obavljene venepunkcije, igla se povuče iz kože, poveska se otpušta, a mjesto venepunkcije prekriva odgovarajućim sterilnim pokrovom. Pribor za uzimanje krvi obavezno se odbacuje u odgovarajući spremnik za oštar otpad.

4.2. Bočice za hemokulturu

Bočice za hemokulturu sadrže tekuće hranjive podloge specijalizirane za rast i kultivaciju određenih bakterija. Bočice se do upotrebe čuvaju na suhom i hladnom mjestu (2-25°C), zaštićenom od sunčeve svjetlosti (39). Krv dobivena venepunkcijom direktno se inokulira u dvije bočice u podjednakom omjeru volumena krvi. Aerobna bočica podržava rast obligatorno aerobnih i fakultativno anaerobnih

mikroorganizama. Sadržaj anaerobne bočice je takav da podržava rast obligatorno anaerobnih i fakultativno anaerobnih organizama. U pojedinu bočicu aseptički se inokulira 8 do 10 mL venske krvi. Kako bi se spriječilo zgrušavanje, inokulirane bočice treba lagano zaokrenuti nekoliko puta za miješanje krvi s tekućom hranjivom podlogom (10). Nakon toga, bočice bi trebalo transportirati što je brže moguće u laboratorij. Ondje se bočice unose u automatizirani termostat, primjerice BACTEC FX s kompatibilnim komercijalnim tekućim hranjivim podlogama, koje se razlikuju svojim sastavom. U slučaju odgođenog transporta, bočice se nikada ne smiju odlagati u hladnjak ili smrzavati, već držati na sobnoj temperaturi ne dulje od nekoliko sati (10, 24).

4.3. Automatizirani uređaji za kontinuirano praćenje hemokultura

BACTEC FX i slični uređaji predstavljaju u potpunosti automatizirani sustav koji kontinuirano monitorira hemokulture i detektira rast mikroorganizama u kliničkim uzorcima. Bočice se inkubiraju u uređaju i periodički kontroliraju na znakove rasta bakterija. Svaka bočica sadrži senzor koji reagira na porast koncentracije CO_2 ili pad koncentracije O_2 (30). Ugljikov dioksid mikroorganizmi proizvode metabolizmom hranjivih tvari u bočici, a kisik iskorištavaju za svoj rast i diobu. Uređaj prekontrolira senzor svakih deset minuta tragajući za porastom u njegovoj fluorescenciji. Porast u fluorescenciji je razmjeran povećanju količine CO_2 ili smanjenju količine O_2 prisutnog u bočici. Uređaj će signalizirati prisutnost pozitivne hemokulture na nekoliko načina:

• čuje se zvučni signal te zaslon na računalu počne bljeskati.

• lampica na prednjoj strani uređaja počne svjetliti (30).

Postoje uređaji za hemokulture različitog kapaciteta. Neki mogu pohraniti 120, a neki 240 bočica za ispitivanje. Više jedinica za inkubaciju bočica se može umrežiti s jednim računalom, radi lakšeg korištenja u velikim laboratorijima gdje se obrađuje velik broj hemokultura mjesečno (30). Nakon što je uređaj signalizirao rast bakterija, pozitivna bočica se vadi iz uređaja. I dalje treba voditi računa o mjerama opreza pri rukovanju bočicama, osigurati aseptične uvjete te uzorke odložiti u biološki siguran okoliš. Uzorak iz bočice sada se koristi za pripremu mikroskopskog preparata koji se boja po Gramu. Na temelju Gram preparata i kliničkih podataka o pacijentu radi se preliminarna dijagnoza bakteriemijske etiologije, a rezultat dojavljuje odgovornom kliničaru (24). Slijedi daljnje kultiviranje uzoraka na hranilišta za rast bakterija radi konačne identifikacije uzročnika i izrade antibiograma.

4.3.1. Tekuće hranjive podloge za hemokulturu

Ukoliko je pacijent primio terapiju uoči uzimanja hemokulture, krv može sadržavati antimikrobne lijekove koji mogu usporiti ili spriječiti rast mikroorganizama. Stoga se uglavnom koriste specijalizirane hranjive podloge s dodatkom smole koje učinkovito neutraliziraju širok raspon antimikrobnih sredstava, čime se omogućava rast mikroorganizama koji inače ne bi rasli na standardnoj hranjivoj podlozi. U bolesnika koji već prima antimikrobni lijek, postoji značajno povećana pozitivnost, u rasponu od 15% do 35%, kada se za hemokulturu koriste hranjive podloge na bazi smole u usporedbi s hranjivim podlogama koje nisu na bazi smole (18). Postoje i hranjive podloge specijalizirane za uzorke malih volumena (≤ 3 ml) krvi u pedijatrijskih pacijenata. U njih se uzima 1 do 3 ml krvi i cijela količina inokulira u jednu bočicu. Ovaj medij je također obogaćen smolama za neutralizaciju antimikrobnih lijekova.

4.4. Bakteriološke kulture i biokemijski testovi

Kao što je navedeno, nakon bojenja po Gramu, slijedi daljnja identifikacija i ispitivanje osjetljivosti mikroorganizma na antibiotike prema laboratorijskom protokolu. Mediji za kultivaciju bakterija su hranilišta koja svojim sastavom omogućavaju rast, razmnožavanje i metabolizam bakterija. Hranjive podloge se uglavnom nalaze u Petrijevim zdjelicama i epruvetama različitih volumena. Bakterije se u kulturi množe i stvaraju kolonije, tipične za pojedinu vrstu bakterije. Pri identifikaciji bakterija, određujemo morfološke karakteristike kolonija (boja, veličina, oblik). Osim morfologije kultiviranih bakterijskih kolonija, potrebno je odrediti i biokemijske (metaboličke) karakteristike bakterija. Biokemijske karakteristike predstavljaju sposobnost bakterije da razgradi pojedine kemijske spojeve, odnosno sintetizira enzime odgovorne za tu razgradnju (40). To znači da ne postoji jedinstvena podloga za uzgoj svih vrsta bakterija, nego sastav podloge veoma varira. Ovisno o vrsti bakterije koja se želi uzgojiti, u hranjivu podlogu dodaju se odgovarajući kemijski spojevi. S obzirom na sastav i

specifičnu namjenu, razlikujemo podloge opće namjene (neselektivne), selektivne i diferencijalne hranjive podloge (40). Postoji i klasifikacija hranjivih podloga prema konzistenciji. Tekuće hranjive podloge koriste se samo za pospješivanje rasta bakterija. Porast bakterija na ovakvim podlogama ne otkriva konačan identitet bakterije. Nakon što se dobije kritična masa bakterijskih kolonija, vrše se daljnja biokemijska, fiziološka i genetska ispitivanja u svrhu konačne identifikacije.

Polutekuće (polukrute) hranjive podloge koriste se za ispitivanje pokretljivosti bakterija. Čvrste hranjive podloge (agari) primjenju se za izolaciju čiste kulture bakterija te za njihovu pohranu. Čvrstoća podloge postiže se dodatkom različitih količina agara. U čvrstim hranjivim podlogama koncentracija agara je od 1 do 5 %, a u polutekućim od 0.1 do 0.5 % (40).

5. MOLEKULARNE METODE DETEKCIJE BAKTERIJA U KRVI

Hemokultura je standardna dijagnostička metoda za dokaz bakteriemije. Nedostatak ove metode je dugotrajnost obrade (41). Stoga se danas praksa okreće prema novim molekularnim metodama koje su razvijene s namjerom da se ubrza konačna identifikacija mikroorganizma. Zaista, najbrža mikrobiološka metoda trenutno je polimerazna lančana reakcija u stvarnom vremenu (real-time PCR) koja može dati dijagnozu unutar 6 h od uzimanja krvi (42). Molekularne metode imaju niz prednosti i nedostataka u odnosu na konvencionalnu hemokulturu.

5.1. Prednosti molekularne dijagnoze izravno iz krvi

Jedna od glavnih prednosti molekularnih metoda je uvelike smanjeno vrijeme do konačnih rezultata. Identifikacija mikroorganizama ne ovisi o bakteriološkoj kulturi čija kultivacija može varirati od nekoliko sati do nekoliko dana (43). PCR ima nizak prag detekcije i potencijalno je osjetljivija metoda od hemokulture. Međutim, visoka osjetljivost PCR-a izbalansirana je malim volumenom koji se koristi za PCR (manje od 500 µL krvi) u usporedbi s konvencionalnom hemokulturom, koja se inokulira s 8 do 10 mL krvi (44). Osim toga, molekularne metode mogu lakše otkriti bakteriemiju u prethodno liječenih bolesnika jer detektiraju bakterijsku DNA, odnosno broj kopija genoma (GC) po mililitru dok hemokulture zahtijevaju cjelovite i vijabilne mikroorganizme. Informacije koje pruža kvantitativni real -time PCR pomažu u interpretaciji kliničke važnosti rezultata. Kvantifikacija također može dati korisne informacije za praćenje stanja bakteriemije nakon početka primjene antimikrobnog lijeka (43). Naposljetku, postoje mehanizmi genske rezistencije koji se mogu detektirati pomoću komercijalnih PCR testova unutar 1 do 2 sata (npr. mecA gen) (38).

5.2. Nedostaci molekularne dijagnostike izravno iz krvi

Molekularni testovi koji otkrivaju gensku rezistenciju su korisni, ali mogu navesti na krivi zaključak jer ne potvrđuju nužno fenotip patogena. Neki patogeni često koriste i nekoliko mehanizama rezistencije (primjerice Pseudomonas aeruginosa) (13). Pri određivanju osjetljivosti na antimikrobne lijekove u takvih bakterija neophodno je učiniti hemokulturu i antibiogram. Stoga je veliki nedostatak molekularnih metoda taj što ne pružaju pouzdane podatke o antimikrobnoj osjetljivosti brže od konvencionalnih metoda. Nadalje, postoje podaci koji upućuju da metode amplifikacije ne detektiraju sve klinički relevantne bakterije (45, 46). Detekcija mikrobne DNA u krvi pomoću PCR-a nije uvijek klinički značajna. Lažno pozitivni PCR nalazi mogu biti uzrokovani cirkulacijom DNA iz mrtvih bakterija u odsutnosti infekcije. Objašnjenje leži u tome da bakterijska DNA može nekoliko dana perzistirati u krvi nakon uspješne fagocitoze i primjene učinkovite antimikrobne terapije. Ipak, najveći nedostatak molekularnih metoda je taj što zahtijevaju opremljenost laboratorija, obučenost osoblja i, u odnosu na tradicionalnu tehniku hemokulture, troškovi su značajno veći (41).

6. INTERPRETACIJA REZULTATA

6.1. Tumačenje pozitivnih hemokultura

Rezultati pozitivne hemokulture ponekad se lako tumače, ali često predstavljaju pravi izazov za liječnike i kliničke mikrobiologe. Laboratorijski nalaz i njegovu kliničku važnost uvijek treba procijeniti u kontekstu kliničke slike pacijenta. Postoji nekoliko čimbenika koje liječnicima i mikrobiolozima služe da dođu do točne interpretacije rezultata. Za početak, identitet mikroorganizma izoliranog iz pozitivne hemokulture ima određenu prediktivnu vrijednost. Uobičajeni krvni izolati koji gotovo uvijek predstavljaju pravu bakteriemiju su Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa i Candida albicans (24). Drugi mikroorganizmi poput Corynebacterium spp. i Cutibacterium (ranije poznat kao Propionibacterium spp.) gotovo uvijek predstavljaju kontaminaciju (24). Detekcija viridans-grupe streptokoka, koagulaza-negativnih stafilokoka i enterokoka još uvijek je problematična za tumačenje, budući da su neke studije pokazale da mogu predstavljati pravu bakteriemiju u 38%, 15% i 78% slučajeva (47).

Jednako tako, uzorak pozitiviteta hemokultura ima vrijednost pri određivanju kliničke značajnosti izolata. Kada su većina ili sve hemokulture dobivene neovisnim venepunkcijama pozitivne na isti mikroorganizam, vjerojatnost da ovo predstavlja pravu bakteriemiju je izuzetno visoka, bez obzira na identitet organizma (48). To je slučaj kod stanja kod kojih je bakteriemija kontinuirana poput endokarditisa i drugih intravaskularnih infekcija. S druge strane, prisutnost samo jednog pozitivnog seta hemokulture od nekoliko uzetih za analizu snažno sugerira da pozitivan nalaz predstavlja kontaminaciju (10). Ukoliko i dalje nismo sigurni predstavlja li izolirani mikroorganizam klinički značajan nalaz ili ne, još jedan koncept koji pomaže u tumačenju nalaza je tzv. "diferencijalno vrijeme do pozitivnosti" . To je vrijeme proteklo od kada je uzet uzorak venske krvi za hemokulturu do pozitivnog rezultata u automatiziranom termostatu (38). Kada se izolira dvojben nalaz iz uzorka, kliničari bi trebali posumnjati na kontaminaciju ako je bilo potrebno više od 48-72 sata da

mikroorganizmi porastu, upućujući na to da su prisutni u malim količinama (38). Kada se ti isti patogeni detektiraju u manje od 24 do 48 sati od trenutka kada je uzeta krv, vjerojatnost da su pravi uzročnici bakteriemije ipak postoji. Diferencijalno vrijeme do pozitivnosti koristi se također kako bi se potvrdilo je li kateter uistinu izvor infekcije (18). Analiziraju se dva seta hemokultura, jedan uzet perifernom venepunkcijom, a drugi iz intravaskularnog katetera. Ako je hemokultura uzeta na jednom mjestu pozitivna najmanje 90-120 minuta prije nego hemokultura uzeta na drugom anatomskom mjestu (venepunkcijom ili iz katetera), rezultati upućuju na to da mjesto s ranijim pozitivitetom ima veću koncentraciju organizama i izvor je infekcije (49).

6.2. Tumačenje rezultata molekularnih metoda

Kao i nalaz hemokulture, tako i nalaz dobiven molekularnim metodama treba oprezno tumačiti. Kao i kod konvencionalnog pristupa, i ovdje identitet izoliranog mikroorganizma govori u prilog njegovoj signifikantnosti. Nadalje, velika osjetljivost PCR-a smatra se njegovom prednošću u odnosu na standardnu hemokulturu. Međutim, PCR će s jednakom osjetljivošću detektirati i klinički relevantne mikroorganizme kao i one koji to nisu. Stoga, lažno pozitivni rezultati mogu biti posljedica kontaminacije ili već sanirane infekcije. Rješenje ovog problema leži u mogućnosti direktne kvantifikacije mikroorganizama u krvi pomoću molekularnih metoda. Dakle, kvantitativni real time PCR pomaže razlučiti između kontaminacije i prave bakteriemije jer kontaminaciju općenito karakterizira vrlo niska količina bakterija (43).

7. IZVJEŠTAVANJE REZULTATA

7.1. Pozitivan preliminarni rezultat

Pozitivna hemokultura u automatiziranom termostatu nakon koje slijedi bojenje po Gramu daje brzu i vjerojatnu identifikaciju bakterije i izvorišta bakteriemije (13). Nalaz koji se dobije na temelju morfologije bakterija vidljivih u mikroskopskom preparatu po Gramu smatra se preliminarnim. Ovaj rezultat može prenijeti samo liječnik mikrobiolog odgovornom kliničaru ili drugom članu zdravstvenog tima koji brine o pacijentu, usmeno ili telefonski (50, 51). Preliminarni rezultat daje kliničaru vrijedne informacije korisne za određivanje početne antimikrobne terapije. Preliminaran rezultat dobiva se i na osnovu biokemijskog testiranja i određivanja osjetljivosti izolata na antimikrobne lijekove direktno iz pozitivne bočice.

7.2. Pozitivan konačan rezultat

Konačnim rezultatom identifikacije i osjetljivosti izolata smatramo onaj dobiven iz čiste bakterijske kulture uzgojene na krutoj hranjivoj podlozi. Testiranje osjetljivosti izvodi se prema europskim standardima testiranja osjetljivosti na antimikrobne lijekove (EUCAST). Izvještava se u pisanom obliku, a sadrži naziv patogenih bakterija te rezultate osjetljivosti (50).

7.3. Negativan rezultat

Nalaz negativne hemokulture izdaje se kao sterilan za hemokulture u kojima nakon 7 dana inkubacije u automatiziranom sustavu nije došlo do porasta mikroorganizama (51).

8. ZAKLJUČAK

Uzorak krvi za otkrivanje bakteriemije najvažniji je laboratorijski uzorak koji zahtijeva neodložnu mikrobiološku obradu. S odgodama u dijagnozi i liječenju sepse, stopa smrtnosti može se povećati i do 50% (52). Ovakva nepovoljna statistika predstavlja značajan gubitak i opterećenje za zdravstvo, a i društvo u cjelini. Stoga brza identifikacija uzročnika bakteriemije u uzorku krvi i određivanje osjetljivosti na antibiotike ima nekoliko povoljnih ishoda. Pravovremena dijagnoza i ciljana terapija neće samo smanjiti stope morbiditeta i mortaliteta, nego će se smanjiti i nepotrebna primjena antibiotika, njihova toksičnost i razvoj bakterijske rezistencije. Sve to zajedno rezultirat će smanjenjem bolničkih troškova i ima povoljan učinak na zdravstvo. Ostvaren je značajan tehnološki napredak te se u praksu uvode nove molekularne tehnike izolacije mikroorganizama. Međutim, ove metode imaju svoje prednosti i ograničenja te konačnu odluku o njihovoj implementaciji u svakodnevnu praksu treba donijeti lokalno, ovisno o potrebama pojedinog laboratorija. One mogu biti koristan dodatak konvencionalnim metodama, ali ih danas još uvijek ne mogu zamijeniti u praksi. Zaključak je da konvencionalne metode hemokulture ostaju i dalje dominantan pristup za dijagnozu bakteriemije. Dakle, odgovarajuće i pažljivo prikupljanje uzoraka, odgovarajuća obrada uzoraka i precizno tumačenje rezultata ostaju neophodni za najučinkovitiju skrb pacijenata sa sumnjom na bakteriemiju.

9. ZAHVALE

Najljepše se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ani Budimir na njenom strpljenju, podršci i stručnosti koju mi je pružila prilikom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se svojim prijateljima i svojim dvjema sestrama jer su mi uvijek davali bezgraničnu podršku i razumijevanje tijekom mojih šest godina studija.

Na kraju želim izreći jedno posebno hvala svojim roditeljima, bez čije požrtvovnosti, podrške i ljubavi ne bih bila ovdje gdje sam danas.

10. POPIS LITERATURE

1. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001 – αίμα; [ažurirano 26.05.2017.; pristupljeno 12.6.2017.]. Dostupno na: https://en.wiktionary.org/wiki/αἷμα

2. LevyMM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E. i sur; InternationalSepsisDefinitions Conference. Intensive Care Med. 2003 Apr;29(4):530-8

3. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*.1992;20(6):864-874.

4. Churpek MM, Zadravecz FJ,Winslow C, Howell MD, Edelson DP. Incidence and prognostic value of the systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunctions in ward patients. *Am J RespirCrit Care Med*. 2015;192(8):958-964.

5. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001 – Sindrom sustavna upalnog odgovora;[ažurirano 13.03.2013; pristupljeno 12.6.2017.]. Dostupno na:https://hr.wikipedia.org/wiki/Sindrom_sustavna_upalnog_odgovora

6. Kaukonen K-M, BaileyM, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl JMed*. 2015;372(17):1629-1638.

7. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M i sur. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).JAMA. 2016 Feb 23;315(8):801-10. doi: 10.1001/jama.2016.0287.

8. Infections of the Blood. Clinical Presentation and Pathogenesis. U: Stephen DA, William MJ, Elmer WK, Paul CS, Washington CW, ur. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6.izd. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. Str. 97 - 110

9. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al;Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive CareMed*. 1996;22(7):707-710.

10. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP.Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Rev. 1997 Jul;10(3):444-65.

11. Peña C., Pujol M., Ardanuy C., et al. An outbreak of hospitalacquired *Klebsiella pneumoniae*, including strains producing extended-spectrum Beta-Lactamase. J Hosp Infect 2001;47:53-9.

12. Luzzaro F, Ortisi G, Larosa M, Drago M, Brigante G, Gesu G. Prevalence and epidemiology of microbial pathogens causing bloodstream infections: results of the OASIS multicenter study. Diagn Microbiol Infect Dis 2011;69:363–9.

13. Huttunen R, Syrjänen J, Vuento R, Aittoniemi J. Current concepts in the diagnosis of blood stream infections. Are novel molecular methods useful in clinical practice? Int J Infect Dis. 2013 Nov;17(11):e934-8. doi: 10.1016/j.ijid.2013.04.018.

14. Lizaso D, Aguilera CK, Correa M, et al. Epidemiología y factores de riesgo de mortalidad de las bacteriemias intrahospitalarias por bacilos gramnegativos. Rev Chilena Infectol. 2008;25:368–73.

15. WHO. Prevention of hospital-acquired infections: a practical guide; 2002 (updated 2002; cited). Available from: http://www. who.int/csr/resources/publications/drugresist/WHO CDS CSR EPH 2002 12/en/ [Revised: march 7, 2011].

16. Skogberg K, Lyytikainen O, Ollgren J, Nuorti JP, Ruutu P. Population-based burden of bloodstream infections in Finland. Clin Microbiol Infect 2012;18: E170–6.

17. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017.

18.Towns ML, Jarvis WR, Hsueh PR. Guidelines on blood cultures. J Microbiol Immunol Infect. 2010 Aug;43(4):347-9. doi: 10.1016/S1684-1182(10)60054-0.

19. Begovac J, Božinović D, Lisić M, Baršić B, Schönwald S, ur. Infektologija. Zagreb: Profil International, 2006.

20. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, and the European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. Euro Surveill. 2015;20(45).

21. European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenemase-producing bacteria in Europe: interim results from the European survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) project. Stockholm: ECDC; 2013. Available from: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/ Publications/antimicrobial-resistance-carbapenemase-producing-bacteria-europe.pdf

22. European Centre for Disease Prevention and Control. Vaccine scheduler [Website]. Available from: http://vaccine-schedule.ecdc. europa.eu/Pages/Scheduler.aspx

23. Dilnessa T, Demeke G, Mengistu G, Bitew A (2016) Emerging Blood Culture Technologies for Isolation of Blood Pathogens at Clinical Microbiology Laboratories. J Med Microb Diagn 5: 227. doi:10.4172/2161-0703.1000227

24. Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret.Clin Microbiol Infect. 2013 Jun;19(6):513-20. doi: 10.1111/1469-0691.12180.

25. Doern, GV. Blood cultures for the detection of bacteremia. U: UpToDate, Calderwood SB ur. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2013 [pristupljeno 12.06.2017.] Dostupno na: www.uptodate.com

26. Riedel S, Bourbeau P, Swartz B, et al. Timing of specimen collection for blood cultures from febrile patients with bacteremia. J Clin Microbiol 2008; 46:1381.

27. Mermel, L. A., and D. G. Maki. 1993. Detection of bacteremia in adults: consequences of culturing an inadequate volume of blood. Ann. Intern. Med. 119:270–272.

28. Washington, J. A. 1975. Blood cultures: principles and techniques. Mayo Clin. Proc. 50:91–97.

29. Weinstein, M. P., L. B. Reller, J. R. Murphy, and K. A. Lichtenstein. 1983. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. Rev. Infect. Dis. 5:35–53.

30. BD Life Sciences – Diagnostic Systems CLSI formatted procedures. AUTOMATED BLOOD CULTURE BACTEC™ 9240/9120/9050 [Internet] Franklin Lakes, NJ : Becton, Dickinson and Company; 2017 [pristupljeno 12.06.2017.]. Dostupno na:http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-9000bc2.pdf

31. Wilson ML, Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and procedures for blood cultures: Approved guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.

32. Gaur AH, Giannini MA, Flynn PM et al. Optimizing blood culture practices in pediatric immunocompromised patients: Evaluation of media types and blood culture volume. Pediatr Infect Dis J 2003; 22: 545–552.

33. Little JR, Murray PR, Traynor PS, Spitznagel E. A randomized trial of povidoneiodine compared with iodine tincture for venipuncture site disinfection: effects on rates of blood culture contamination. Am J Med 1999; 107:119.

34. Strand CL, Wajsbort RR, Sturmann K. Effect of iodophor vs iodine tincture skin preparation on blood culture contamination rate. JAMA 1993; 269:1004.

35. Mimoz O, Karim A, Mercat A, et al. Chlorhexidine compared with povidoneiodine as skin preparation before blood culture. A randomized, controlled trial. Ann Intern Med 1999; 131:834.

36. King TC, Price PB. An evaluation of iodophors as skin antiseptics. Surg Gynecol Obstet. 1963; 116:361–365. [PubMed: 14032870]

37. Archibald LK, Pallangyo K, Kazembe P, Reller LB. Blood culture contamination in Tanzania, Malawi, and the United States: a microbiological tale of three cities. J Clin Microbiol 2006; 44:4425.

38. Murray PR, Masur H. Current approaches to the diagnosis of bacterial and fungal bloodstream infections in the intensive care unit. Crit Care Med. 2012 Dec;40(12):3277-82. doi: 10.1097/CCM.0b013e318270e771.

39. Dijagnostika ostalih bakterijskih bolesti [Internet]. Zadar: Zavod za javno zdravstvo; 2017 [pristupljeno 12.06.2017.]. Dostupno na: http://www.zjz-zadar.hr/hr/sluzbe/mikrobiologija-i-parazitologija/uzorci-i-pretrage/uzorci/107-ch-0?&l_over=1

40. Palijan G. Praktikum iz mikrobiologije: bakteriologija [Internet]. Zavod za kvantitativnu ekologiju. [pristupljeno 12. 06.2017.]. Dostupno na: http://biologija.unios.hr/webbio/wpcontent/uploads/2013/predavanja/mikrobiologija-bakteriologija.pdf

41. Lukić Grlić A. Mogućnosti mikrobiološke dijagnostike u potpornoj terapiji djece s malignim bolestima. Paediatrica Croatica. 2009; 53 (4): 296 – 296

42. Dark P, Wilson C, Blackwood B, McAuley DF, Perkins GD, MCMullan R, et al. Accuracy of LightCycler(R) SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review protocol. BMJ Open 2012;2:e000392.

43. Opota O, Jaton K, Greub G.
Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. Clin Microbiol Infect. 2015 Apr;21(4):323-31. doi: 10.1016/j.cmi.2015.02.005.

44. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture–based diagnosis of bacteremia: state of the art. Clin Microbiol Infect 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.01.003.

45. Mauro MV, Cavalcanti P, Perugini D, Noto A, Sperli D, Giraldi C. Diagnostic utility of LightCycler SeptiFast and procalcitonin assays in the diagnosis of blood-stream infection in immunocompromised patients. Diagn Microbiol Infect Dis 2012;73:308–11.

46. Yanagihara K, Kitagawa Y, Tomonaga M, Tsukasaki K, Kohno S, Seki M, et al. Evaluation of pathogen detection from clinical samples by real-time polymer-ase chain reaction using a sepsis pathogen DNA detection kit. Crit Care 2010;14:R159.

47. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: A prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. Clin Infect Dis 1997; 24: 584–602.

48. Weinstein MP, Murphy JR, Reller LB, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood cultures: A comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. Ii. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. Rev Infect Dis 1983; 5: 54–70.

49. Seifert H, Cornely O, Seggewiss K, Decker M, Stefanik D, Wisplinghoff H, Fatkenheuer G. Bloodstream infection in neutropenic cancer patients related to short-term nontunnelled catheters determined by quantitative blood cultures, differential time to positivity, and molecular epidemiological typing with pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 2003; 41(1):118–123.

50. Hemokultura bakteriološki i mikološki [Internet]. Zavod za javno zdravstvo Varaždinske županije; 2017 [pristupljeno 12.06.2017.]. Dostupno na: http://zzjzzv.hr/articlefiles/upute/Hk%20bakt.pdf

51. Laboratoriji kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju [Internet]. Klinički bolnički centar Split; 2017 [pristupljeno 12.06.2017.]. Dostupno na: https://www.kbsplit.hr/sites/default/files/Laboratoriji_Klinickog_zavoda_za_mikrobiologiju_i_parazitologiju.pdf

52. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey and scott's diagnostic microbiology: A textbook for isolation and identification of pathogenic microorganisms. In: St. Louis , editor. The mosby company. C. V. Mosby; 2007. p. 378.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 08. rujna 1992. godine u Požegi. Završila sam Osnovnu školu Dobriše Cesarića u Požegi. Zatim sam pohađala Prirodoslovno – matematičku gimnaziju u Požegi, koju završavam s odličnim uspjehom te u srpnju 2011.godine upisujem Medicinski fakultet u Zagrebu. Tijekom studija bila sam članica Međunarodne udruge studenata medicine Hrvatske – CroMSIC te Y - Peer (youth peer) edukator na temu reproduktivnog zdravlja, uključujući HIV/AIDS i kontracepciju. Položila sam FCE (First Certificate in English) i CAE (Certificate in Advanced English) ispite. Aktivno se služim i njemačkim jezikom te sam završila tečaj hrvatskog znakovnog jezika.