



Srpsko udruženje za kliničku mikrobiologiju

SUKM

VODIČ ZA MIKROBIOLOŠKU DIJAGNOSTIKU SEPSE

Prof. dr Ivana Ćirković
Prim. dr sci. med. Snežana Brkić
Prof. dr Vera Mijač
Doc. dr Biljana Međo
Doc. dr Dragana Unić-Stojanović
Prof. dr Dajana Lendak

2024.



Vodič za mikrobiološku dijagnostiku sepse

Prof. dr Ivana Ćirković

Prim. dr sci. med. Snežana Brkić

Prof. dr Vera Mijač

Doc. dr Biljana Međo

Doc. dr Dragana Unić-Stojanović

Prof. dr Dajana Lendak

2024.

Autori

Prof. dr sci. med. Ivana Ćirković, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet, Beograd

Prim. dr sci. med. Snežana Brkić, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku "Konzilijum", Beograd

Prof. dr sci. med. Vera Mijač, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet, Beograd

Doc. dr sci. med. Biljana Međo, Univerzitetska dečja klinika, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet, Beograd

Doc. dr sci. med. Dragana Unić-Stojanović, Institut za kardiovaskularne bolesti Dedinje, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet, Beograd

Prof. dr sci. med. Dajana Lendak, Klinika za infektivne bolesti, Univerzitetski klinički centar Vojvodine, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad

Recenzenti

Prof. dr sci. med. Slobodanka Đukić, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet, Beograd

Prof. dr sci. med. Radmilo Janković, Univerzitetski klinički centar Niš, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš

Prof. dr sci. med. Goran Stevanović, Klinika za infektivne i tropske bolesti, Univerzitetski klinički centar Srbije, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet, Beograd

IMPRESUM

Izdavač: Srpsko udruženje za kliničku mikrobiologiju - SUKM

Dr Subotića 1, Savski Venac, Beograd

Za izdavača: Prof. dr Ivana Ćirković

Godina izdavanja: 2024. godina

Urednik: Prof. dr Ivana Ćirković

ISBN: 978-86-906584-1-1

CIP - 616.94-074(083.1) (Katalogizacija u publikaciji Narodna biblioteka Srbije, Beograd)

Dizajn i priprema: Vladimir Gavrić - Aria IT, Karađorđev trg 34, Beograd

Štampa: "Caligraf soft" Kosovska 6, 11080 Zemun

Tiraž: 300 primeraka

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Definicija sepe	1
1.2. Kriterijumi za dijagnozu sepe kod odraslih pacijenata.....	2
1.2.1. Rana dijagnoza sepe - skrining sepe	2
1.2.2. Laboratorijsko ispitivanje	3
1.2.3. Biomarkeri sepe.....	3
1.3. Pedijatrijska sepsa.....	4
2. MIKROBIOLOŠKA DIJAGNOSTIKA INFEKCIJE KRVI.....	6
3. PREANALITIČKA FAZA.....	7
3.1. Indikacije za uzimanje krvi	7
3.2. Uzimanje krvi	7
3.2.1. Volumen krvi	7
3.2.2. Broj uzoraka (broj setova hemokultura).....	9
3.2.3. Vreme i mesto uzimanja krvi.....	9
3.2.4. Vađenje krvi	10
3.3. Transport.....	11
3.4. Prijem u mikrobiološku laboratoriju.....	11
4. ANALITIČKA FAZA.....	12
4.1. Automatizovani sistemi za inkubaciju hemokultura.....	12
4.1.1. Vrste bočica za hemokulturu.....	13
4.2. Manuelno obrađivanje hemokultura.....	14
4.3. Postupak sa pozitivnom bočicom za hemokulturu.....	15
4.4. Preparat iz hemokulture obojen po Gramu.....	15
4.5. Subkultivisanje	16
4.6. Identifikacija i testiranje antimikrobne osetljivosti.....	16
4.6.1 Brze i automatizovane metode za identifikaciju direktno iz pozitivnih hemokultura	16
4.6.2. Fenotipsko testiranje antimikrobne osetljivosti.....	17
4.6.3. Molekularni antibiogram – detekcija gena rezistencije.....	18
4.7. Direktna detekcija uzročnika u krvi.....	19
5. POSTANALITIČKA FAZA.....	20
5.1. Izveštaj o ispitivanju.....	20
5.1.1. Preliminarni izveštaj o ispitivanju	20
5.1.2. Finalni izveštaj o ispitivanju	20

5.1.3. Tumačenje rezultata.....	20
5.1.4. Ograničenja	22
5.2. Čuvanje izolata	22
6. IZOLOVANJE RETKIH I PROBIRLJIVIH BAKTERIJA.....	23
6.1. HACEK grupa	23
6.2. <i>Bartonella</i> spp.	23
6.3. <i>Brucella</i> spp. i <i>Francisella</i> spp.	23
6.4. <i>Campylobacter</i> spp. i <i>Helicobacter</i> spp.....	23
6.5. <i>Legionella</i> spp.	24
6.6. <i>Leptospira</i> spp.	24
6.7. <i>Abiotrophia</i> spp. i <i>Granulicatella</i> spp.....	24
6.8. <i>Mycoplasma</i> spp.	24
7. POSEBNA RAZMATRANJA.....	25
7.1. Infekcije krvi povezane sa intravaskularnim kateterom.....	25
7.2. Infektivni endokarditis	25
7.3. Gljivične infekcije krvi.....	26
7.4. Hemokulture u cilju praćenja i nadzora.....	26
8. KONTROLA KVALITETA ANALIZE HEMOKULTURA.....	27
8.1. Upravljanje procesima	27
8.1.1. Uzimanje i transport uzoraka za hemokulturu.....	27
8.1.2. Procena potrebnih kapaciteta.....	28
8.1.3. Nabavke i inventar	28
8.1.4. Validacija i verifikacija	28
8.2. Dokumenti i zapisi.....	29
8.3. Upravljanje neželjenim događajima.....	29
8.4. Ocenjivanje i provera	29
8.4.1. Unutrašnja kontrola kvaliteta.....	29
8.5. Procena učestalosti kontaminiranih hemokultura.....	29
8.6. Izveštaj o rezultatima	31
8.7. Posebna razmatranja	31
8.7.1. Praćenje uzorkovanog volumena krvi.....	31
8.7.2. Vremenske norme.....	32
8.7.3. Praćenje LOT brojeva i roka trajanja bočica za hemokulturu.....	32
9. LITERATURA	33

1. UVOD

1.1. Definicija sepsa

Iako je prva zvanična naučna definicija sepsa data tek 1992. godine, pojam sepsa (grč. σήψις) prvi put se pominje još u osmom veku pre nove ere, u Homerovoj Ilijadi, kada je upotrebljena u kontekstu truljenja odnosno, u doslovnom prevodu, „razlaganja organske materije životinjskog ili biljnog porekla“ (1). Razvoj naučne misli kroz 29 vekova proteklih od prvog pominjanja sepsa do danas, produbljivao je razumevanje patofizioloških procesa koji se događaju u sepsi i samim tim menjao i njeno poimanje. Prva spoznaja uloge mikroorganizama u sepsi datira iz kasnih 1800-ih godina, kada su Luj Paster i Robert Koh došli do zaključka da je proces „unutrašnjeg propadanja“ zapravo pokrenut „štetnim mikroorganizmima“. Nedugo zatim, 1903. godine, William Osler zaključuje da „čovjek izgleda umire od reakcije organizma na prisustvo mikroorganizma, a ne od mikroorganizma samog po sebi“ (2), što su verovatno i dva ključna momenta u sveobuhvatnom sagledavanju sepsa.

Prva zvanična definicija sepsa (SEPSIS-1) data je tek 1992. godine, kada je sepsa definisana kao sistemski inflamatorni odgovor (SIRS) na infekciju. U samoj definiciji sadržana su oba kriterijuma potrebna za postavljanje dijagnoze:

- suspektna ili dokazana infekcija (čime je istaknuta uloga mikroorganizma) i
- bar dva pozitivna SIRS kriterijuma
 - telesna temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ ili $< 36^{\circ}\text{C}$,
 - srčana frekvencija $> 90/\text{min}$,
 - frekvencija disanja $> 20/\text{min}$ ili parcijalni pritisak $\text{CO}_2 < 4,3 \text{ kPa}$,
 - leukocitoza $> 12.000/\text{mm}^3$ ili leukopenija $< 4.000/\text{mm}^3$ ili $\geq 10\%$ nesegmentisanih neutrofila u perifernoj krvi (3) (čime je istaknuta uloga odgovora organizma na infekciju).

Teška sepsa definisana je kao sepsa povezana sa organskom disfunkcijom, hipoperfuzijom ili hipotenzijom, bez preciznih smernica o tome kako se klinički definiše svaki od tih pojmova, sa datim primerima poremećenog mentalnog statusa ili oligurije (3). Septički šok definisan je kao infekcijom uzrokovana hipotenzija koja se održava uprkos adekvatnoj nadoknadi tečnosti (3).

Nova definicija data 2001. godine (SEPSIS-2) zadržava praktično iste kriterijume, uz precizniju definiciju organske disfunkcije i prvo uvođenje SOFA skora (videti poglavlje 1.2.) u zvanične smernice za sepsu, kao precizne alatke za merenje stepena te organske disfunkcije koja karakteriše tada korišćeni pojam teške sepsa (4).

Manjkavosti ove dve definicije koje su uočene u kliničkom radu pre svega su niska specifičnost, kojom su mnoga stanja uobičajenog uravnoteženog imunskog odgovora na infekciju proglašavana za sepsu, ili pak u kojem su stanja sistemskog inflamatornog odgovora na druge neinfektivne nokse proglašavana sepsom, naglo i nerealno podižući incidenciju sepsa.

Aktuelna SEPSIS-3 definicija data 2016. godine donekle prevazilazi ovaj problem u potpunosti izbacujući SIRS kriterijume i jasno definišući sepsu kao životnougrožavajuću disfunkciju organa izazvanu neadekvatnim odgovorom organizma na infekciju (5). Razdvajanje sepsa (bez organske disfunkcije) i teške sepsa (sa organskom disfunkcijom) kako je poznato iz SEPSIS-1 i SEPSIS-2 kriterijuma samim tim postaje irelevantno, te se pojam teške sepsa kao takav izbacuje iz dalje upotrebe. Pacijenti koji su prema SEPSIS-1 i SEPSIS-2 kriterijumima klasifikovani kao sepsa sada više ne ispunjavaju kriterijume za postavljanje dijagnoze sepsa, već se smatraju uobičajenim odgovorom organizma na infekciju. Merilo kvantiteta i kvaliteta organske disfunkcije ostaje SOFA skor, čije povećanje za 2 poena uzrokovano suspektom ili dokazanom infekcijom predstavlja jasan kriterijum za postavljanje dijagnoze sepsa (5). Aktuelna definicija septičkog šoka suštinski se ne razlikuje mnogo od prvobitne, definišući ovaj podtip sepsa kao potrebu za primenom vazoaktivnih lekova radi postizanja vrednosti srednjeg arterijskog pritiska preko 65 mmHg i održavanje nivoa laktata preko 2 mmol/l uprkos adekvatnoj nadoknadi tečnosti (5).

Zbog nesumnjivog značaja ovog stanja u svakodnevnoj kliničkoj praksi, kao i kompleksnosti patofizioloških procesa koji se u njemu odvijaju, naučna javnost 2002. godine prvi put pokreće Surviving sepsis campaign sa ciljem davanja detaljnijih smernica za dobru kliničku praksu u lečenju sepse, spram najnovijih naučnih saznanja. Kao jedno od ključnih pitanja ističe se neophodnost pronalaska ravnoteže između potrebe za promptnim započinjanjem antibiotske terapije i potrebe za identifikacijom uzročnika sepse, njegove osetljivosti na antimikrobne lekove i/ili detekcija gena rezistencije. Naime, podatak o tome da svaki sat odlaganja uvođenja antibiotske terapije povećava smrtnost od sepse za 10% obavezuje da se na listi prioriteta u redosledu zbrinjavanja septičnog bolesnika visoko mesto da pravovremenoj aplikaciji antimikrobne terapije. Sa druge strane, postulat uzorkovanja materijala za mikrobiološke analize pre prve doze antibiotika treba da zadrži svoje mesto, zbog nedvosmislenog značaja identifikacije uzročnika kako iz uzorka krvi tako i sa drugih mesta koje su potencijalno ishodište sepse. Ipak, imajući u vidu kliničku sliku sepse i činjenicu da su ti pacijenti kritično oboleli, često sa potrebama za obezbeđivanjem vitalnih funkcija kao prioritetom, te ciljeve u praksi nije uvek lako ispuniti. Najnovije preporuke Surviving sepsis campaign-a aktuelni problem pokušavaju da reše individualizacijom pristupa pacijentu spram verovatnoće da je pacijent septičan, na sledeći način:

- visoka verovatnoća da je pacijent septičan („verovatna sepsa“) – aplikacija antibiotika u prvom satu od postavljanja sumnje na sepsu,
- umerena verovatnoća da je pacijent septičan („moguća sepsa“) – ukoliko je pacijent u stanju šoka aplikacija antibiotika u prvom satu od postavljanja sumnje na sepsu; ukoliko nije u stanju šoka savetuje se sprovođenje dijagnostičkih procedura sa ciljem diferencijacije infektivnih i neinfektivnih uzroka šoka, te administraciju antibiotika unutar tri sata od postavljanja sumnje na sepsu,
- niska verovatnoća da je pacijent septičan – odlaganje uvođenja antibiotika i dalje praćenje pacijenta (6).

Koliko će nove preporuke poboljšati svakodnevni klinički i laboratorijski rad, ostaje da se vidi u budućnosti.

1.2. Kriterijumi za dijagnozu sepse kod odraslih pacijenata

Znaci i simptomi sepse su nespecifični. Ne postoji „zlatni standard“ za dijagnozu sepse. Klinička slika sepse je varijabilna u zavisnosti od izvora inicijalne infekcije i možda nespecifična sve do kasne faze bolesti, kada su znaci i simptomi očigledni. Postoji nekoliko medicinskih stanja koja oponašaju sepsu i treba ih uzeti u obzir u diferencijalnoj dijagnozi (npr. akutna plućna embolija, akutni infarkt miokarda, akutni pankreatitis, akutna transfuzijska reakcija, adrenalna insuficijencija, akutna apstinencija od alkohola, tireotoksikoza) (7).

U cilju rane dijagnoze sepse, neophodno je uzeti u razmatranje anamnestičke podatke i istoriju bolesti, kliničke, laboratorijske i radiografske podatke koji ukazuju na infekciju i disfunkciju organa (7).

1.2.1. Rana dijagnoza sepse - skrining sepse

Glavni razlozi brojnih smrtnih ishoda nastalih kao posledica obolevanja od sepse jesu kasno prepoznavanje i dijagnostikovanje sepse i kasno započinjanje terapije (8). Da bi se mortalitet od sepse smanjio, napravljeni su posebni algoritmi koji pomažu u dijagnostikovanju ove bolesti. Smernice naglašavaju da je sistematski proces skrininga ključan za ranu identifikaciju pacijenata sa sepsom.

Alati za skrining sepse su dizajnirani da omoguće rano postavljanje dijagnoze sepse, i obuhvataju: Skor procene sekvencijalnog popuštanja organa (engl. Sequential Organ Failure Assessment – SOFA skor) (Tabela 1), pojednostavljenu verziju SOFA skora – Brzi SOFA skor (engl. Quick SOFA – qSOFA), sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (engl. Systemic Inflammatory Response Syndrome – SIRS)

(videti poglavlje 1.1.), nacionalni skor ranog upozorenja (National Early Warning Score - NEWS) ili modifikovani skor ranog upozorenja (Modified Early Warning Score – MEWS).

Tabela 1. SOFA skor.

Parametri	0	1	2	3	4
pO ₂ /FiO ₂ mmHg	≥400	<400	<300	<200*	<100*
Trombociti (×10 ³ /μl)	≥150	<150	<100	<50	<20
Bilirubin (mg/dl)	<1,2	1,2–1,9	2,0–5,9	6,0–11,9	>12
Srednji AP, doze kateholamina (μg/kg TM /min) primenjene najmanje jedan sat	≥70 mmHg	<70 mmHg	Dobutamin (bilo koja doza) Dopamin <5	Norepinefrin ≤0,1 Epinefrin ≤0,1 Dopamin 5,1–15	Norepinefrin >0,1 Epinefrin >0,1 Dopamin >15
Glasgow koma skala	15	13-14	10-12	6-9	<6
Kreatinin (mg/dl) Ili Diureza (ml/dan)	<1,2	1,2–1,9	2,0–3,4	3,5–4,9 <500	>5,0 <200

AP, arterijski pritisak; TM, telesna masa

* uz respiratornu potporu

Kriterijumi qSOFA skora su: 1. izmenjena mentalna aktivnost, GCS < 15; 2. hipotenzija, sistolni krvni pritisak ≤ 100 mmHg; 3. tahipneja, broj respiracija ≥ 22/min.

qSOFA skor ne definiše sepsu, nije ni osetljiv ni specifičan za sepsu. Pruža prognostičke informacije i pokazatelj je povećanog rizika od prisustva organske disfunkcije (8,9). U tom smislu, prisustvo najmanje dve varijable sugerise da je pacijent pod visokim rizikom od nepovoljnih ishoda, kao što su smrt u bolnici ili dugotrajni boravak na intenzivnoj nezi kod bolesnika sa potvrđenom ili suspektom sepsom. qSOFA skor je specifičniji, ali manje osetljiv od SIRS kriterijuma za ranu identifikaciju organske disfunkcije izazvane infekcijom (8). Smernice iz 2021. godine uključuju snažnu preporuku protiv upotrebe qSOFA kao jedinstvenog alata za skrining za sepsu (8).

1.2.2. Laboratorijsko ispitivanje

Laboratorijsko ispitivanje treba da uključi kompletnu krvnu sliku sa diferencijalnom formulom; osnovni metabolički panel; merenje koncentracije laktata, prokalcitonina i enzima jetre; ispitivanje koagulacije; i analizu urina. Uzorkovanje arterijske ili venske krvi može odrediti stepen acidobaznih abnormalnosti, koje su uobičajene kod sepse i verovatno su sekundarne zbog hipoperfuzije tkiva (laktacidoze) i bubrežne disfunkcije.

1.2.3. Biomarkeri sepse

Prokalcitonin je marker inflamacije. Vrednost prokalcitonina manja od 0,05 ng/mL smatra se normalnom, a pacijenti sa nivoima manjim od 0,25 ng/mL imaju malu verovatnoću bakterijske sepse. Nivoi prokalcitonina imaju statistički značajan odnos sa težinom sepse. Prema SSC smernicama (8), prokalcitonin povezan sa kliničkom evaluacijom bio je manje efikasan od same kliničke evaluacije u pogledu odlučivanja kada početi sa antimikrobnim lekovima (8). Zbog njegovog poluživota eliminacije, nivoi prokalcitonina su korisni za praćenje odgovora na terapiju i za pružanje smernica za prekid antimikrobne terapije (9).

Nivo laktata u serumu je takođe sastavni deo dijagnoze, lečenja i prognoze sepse, posebno kod bakterijske pneumonije. Povećan nivo laktata kod pacijenata sa sepsom je rezultat hipoksije tkiva, aerobne glikolize ili smanjenog klirensa (npr. disfunkcija jetre). Nivo laktata veći od 18 mg/dL (2 mmol/L) je dijagnostički kriterijum za septički šok u SEPSIS-3. Povišene nivoe laktata ne treba odbaciti kod pacijenata sa sepsom, čak i sa normalnim krvnim pritiskom. Merenje nivoa laktata treba da se vrši svakih četiri do šest sati dok se nivoi ne normalizuju.

1.3. Pedijatrijska sepsa

Sepsa je jedan od glavnih uzroka morbiditeta i mortaliteta u pedijatrijskoj populaciji. Svake godine dvadeset pet miliona novorođenčadi, dece i adolescenata oboli od sepse, a od toga kod tri miliona završi se smrtnim ishodom (10). Mnoga deca koja se izleče od sepse imaju različite vrste sekvela, koje mogu imati dugoročni uticaj na njih i njihove porodice (11).

Pre skoro dve decenije objavljena je prva definicija pedijatrijske sepse, kojom je sepsa definisana kao suspektna ili potvrđena infekcija praćena SIRS-om (12,13). Ova definicija je imala izvesne nedostatke u smislu da je uključivala parametre poput laboratorijskih rezultata i kliničkih intervencija (npr. primena vazoaktivnih lekova) koji nisu uvek dostupni (14). Takođe, ovom definicijom bili su obuhvaćeni mnogi pacijenti sa blagom infekcijom koji nisu zahtevali energično lečenje (15,16). Nakon toga, 2016. godine revidirana je definicija sepse (17), ali ova definicija se zasnivala samo na podacima dobijenim iz adultnih studija, koji se ne mogu ekstrapolirati na pedijatrijsku populaciju. Sepsa kod dece značajno se razlikuje u pogledu epidemioloških i patofizioloških karakteristika, komorbiditeta i ishoda bolesti u odnosu na odrasle (18-21).

Kako prethodna definicija zbog svega gore pomenutog nije bila prilagođena pedijatrijskoj populaciji, nedavno je definisan novi Feniks sepsa kriterijum za pedijatrijsku sepsu i septički šok (Tabela 2) (22). Pedijatrijska sepsa kod dece mlađe od 18 godina sa suspektom ili potvrđenom infekcijom, definisana je sa najmanje dva poena u Feniks sepsa skor, što ukazuje na po život opasnu disfunkciju respiratornog, kardiovaskularnog, koagulacionog i/ili neurološkog sistema. Septički šok je definisan kao sepsa uz prisustvo kardiovaskularne disfunkcije, na koju ukazuje najmanje jedna tačka u vezi sa kardiovaskularnim sistemom u Feniks sepsa skor, uključujući tešku hipotenziju za uzrast, nivo laktata u krvi viši od 5 mmol/L ili potrebu za vazoaktivnim lekovima. Jedna od glavnih prednosti nove definicije je da je praktična za primenu kao i da je primenljiva u sredinama sa različitim resursima.

Tabela 2. Feniks sepsa skor (engl. Phoenix Sepsis Score).^a

Parametri	0	1	2	3
Respiratorni (0-3 poena)	PaO ₂ :FIO ₂ ≥ 400 ili SpO ₂ :FIO ₂ ≥ 292 ^b	PaO ₂ :FIO ₂ < 400 uz respiratornu potporu ili SpO ₂ :FIO ₂ < 292 uz respiratornu potporu ^{b,c}	PaO ₂ :FIO ₂ 100-200 uz IMV ili SpO ₂ :FIO ₂ 148-220 uz IMV ^b	PaO ₂ :FIO ₂ < 100 uz IMV ili SpO ₂ :FIO ₂ < 148 uz IMV ^b
Kardiovaskularni (0-6 poena)	Bez vazoaktivnih lekova ^d Laktati <5 mmol/L ^e	Po 1 poen (do 3) za: 1 vazoaktivni lek ^d Laktati 5-10,9 mmol/L ^e	Po 2 poena (do 6) za: ≥2 vazoaktivna leka ^d Laktati >11 mmol/L ^e	
Srednji arterijski pritisak prema uzrastu, mmHg ^{f,g} < 1 mesec 1 do 11 meseci 1 do < 2 godine 2 do < 5 godina 5 do < 12 godina 12 do 17 godina	>30 >38 >43 >44 >48 >51	17-30 25-38 31-43 32-43 36-48 38-51	<17 <25 <31 <32 <36 <38	
Koagulacioni (0-2 poena) ^h	Trombociti ≥ 100 × 10 ³ /μL INR ≤ 1,3 D-dimer ≤ 2 mg/L FEU Fibrinogen ≥ 100 mg/dL	Po 1 poen (maksimum 2 poena) za: Trombociti < 100 × 10 ³ /μL INR >1,3 D-dimer > 2 mg/L FEU Fibrinogen < 100 mg/dL		

Neurološki (0-2 poena) ⁱ	Glasgow koma skala >10 Zenice reaktivne ^j	Glasgow koma skala ≤ 10 ^j	Fiksirane zenice obostrano	
Feniks sepsa kriterijum (engl. Phoenix Sepsis Criteria)				
Sepsa	Suspektna infekcija i Feniks sepsa skor ≥ 2 poena			
Septički šok	Sepsa sa ≥ 1 kardiovaskularnim poenom			

Modifikovano prema Schlapbach LJ, et al. (22).

FEU, jedinice ekvivalentne fibrinogenu; IMV, invazivna mehanička ventilacija; INR, internacionalni normalizovani odnos protrombinskog vremena; MAP, srednji arterijski pritisak; $\text{PaO}_2:\text{FIO}_2$, arterijskog parcijalnog pritiska kiseonika i inspiratorne frakcije kiseonika; SpO_2 , saturacija kiseonika merena pulsnom oksimetrijom (samo ako je $\text{SpO}_2 \leq 97\%$).

^aSkor se može izračunati u odsustvu nekih parametara (npr. iako se nivo laktata ne određuje i ne koriste se vazoaktivni lekovi, kardiovaskularni skor se još uvek može utvrditi pomoću krvnog pritiska). Očekuje se da će laboratorijska ispitivanja i druga merenja biti učinjena na osnovu kliničke procene. Neizmereni/neodređeni parametri ne doprinose skor. Starost nije korigovana za prevremeno rođenu decu i kriterijumi se ne odnose na decu hospitalizovanu na rođenju i decu čija je postkonceptijska starost manja od 37 nedelja ili one od 18 godina ili više.

^b $\text{PaO}_2:\text{FIO}_2$ se samo računa ako je $\text{SpO}_2 \leq 97\%$.

^cDisfunkcija respiratornog sistema 1 poen može se proceniti kod svakog pacijenta koji dobija respiratornu potporu u vidu oksigenoterapije, uključujući visok protok, neinvazivnu ili invazivnu mehaničku ventilaciju i uključuje $\text{PaO}_2:\text{FIO}_2$ odnos manji od 200 i $\text{SpO}_2:\text{FIO}_2$ odnos manji od 220 kod dece koja ne dobijaju IMV. Za decu koja dobijaju IMV sa $\text{PaO}_2:\text{FIO}_2$ odnosom manjim od 200 i $\text{SpO}_2:\text{FIO}_2$ odnosom manjim od 220, pogledajte kriterijume za 2 i 3 poena.

^dVazoaktivni lekovi uključuju bilo koju dozu adrenalina, noradrenalina, dopamina, dobutamina, milrinona i/ili vazopresina (za šok).

^eReferentni opseg laktata je 0,5 do 2,2 mmol/L. Laktati mogu biti arterijski ili venski.

^fStarost nije korigovana za prevremeno rođenu decu i kriterijumi se ne odnose na decu hospitalizovanu na rođenju i decu čija je postkonceptijska starost manja od 37 nedelja ili one od 18 godine ili više.

^gKoristite izmereni MAP (invazivni arterijski ako je dostupan ili neinvazivan oscilometrijski), a ukoliko izmereni MAP nije dostupan, izračunati MAP ($1/3 \times \text{sistolni} + 2/3 \times \text{diastolni}$) može se koristiti kao alternativa.

^hReferentni opseg parametara koagulacije: trombociti, 150 do $450 \times 10^3/\text{mL}$; D-dimer, <0,5 mg/L FEU; fibrinogen, 180 do 410 mg/dL. Referentni opseg za INR se zasniva na lokalnom referentnom protrombinskom vremenu.

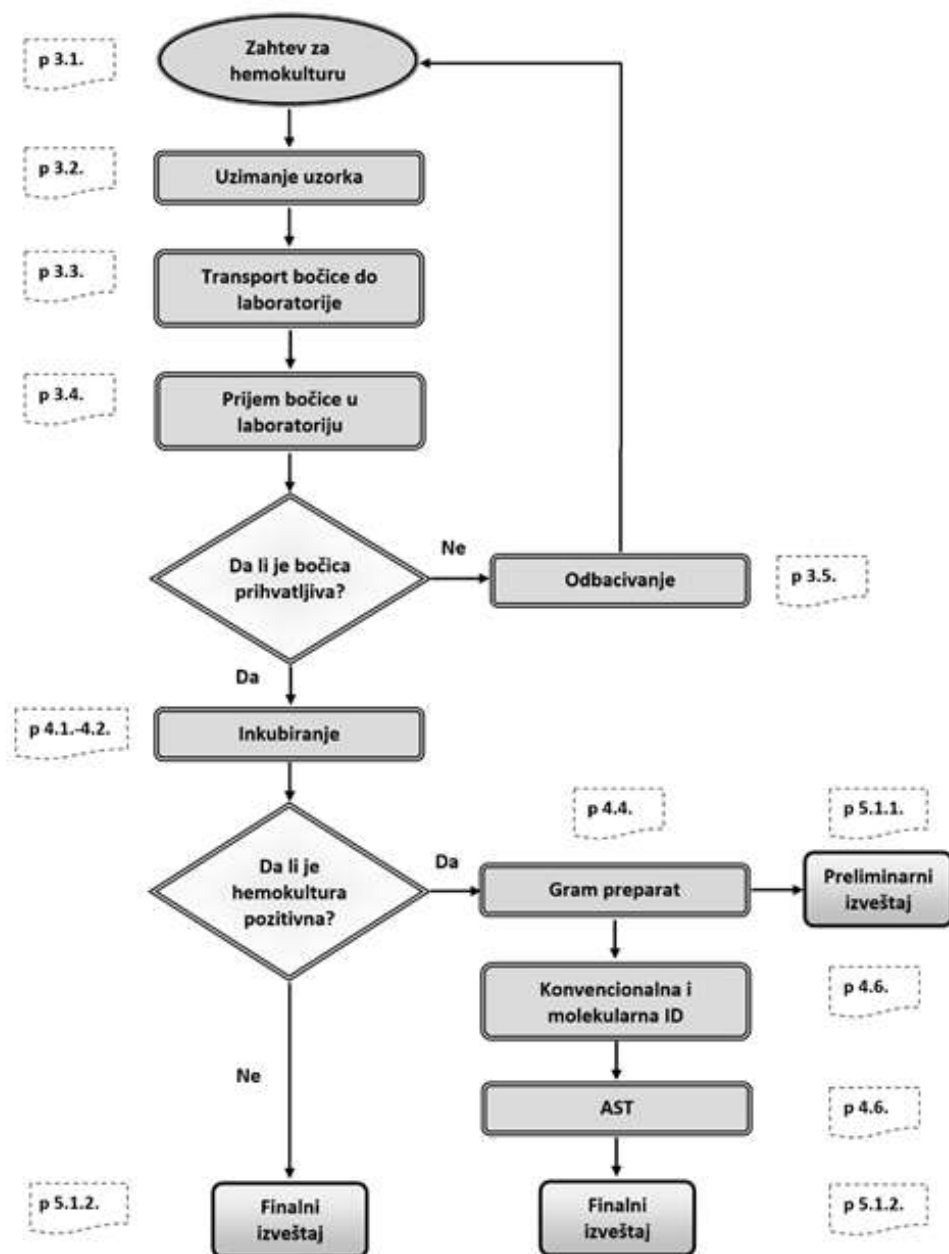
ⁱSubskor neurološke disfunkcije je validan u oba slučaja, kod sediranih i nesediranih pacijenta, i kod onih koji dobijaju ili ne dobijaju IMV.

^jGlasgow koma skala procenjuje svest na osnovu verbalnih, očnih i motornih odgovora (opseg, 3-15, viši skor ukazuje na bolju neurološku funkciju).

2. MIKROBIOLOŠKA DIJAGNOSTIKA INFEKCIJE KRVI

Hemokultura je laboratorijski test u kome se krv uzeta od pacijenta zasejava u bujon u bočici za hemokulturu u cilju utvrđivanja da li su mikroorganizmi (bakterije ili/i gljive) koji izazivaju infekciju prisutni u krvi pacijenta (Dijagram 1).

Hemokulture su namenjene za: (I) dokazivanje prisustva mikroorganizama u krvi, (II) identifikaciju mikrobiološke etiologije infekcije krvi, (III) pomoć pri utvrđivanju izvora infekcija (npr. endokarditis), (IV) obezbeđivanje mikroorganizma za testiranje antimikrobne osetljivosti.



ID, identifikacija; AST, antibiogram/antimikrogram

Dijagram 1. Dijagram toka mikrobiološke dijagnostike infekcije krvi.

3. PREANALITIČKA FAZA

Preanalitička faza mikrobiološke dijagnostike infekcije krvi obuhvata postavljanje indikacija za uzimanje uzorka, uzorkovanje, transport i prijem u mikrobiološku laboratoriju (23).

3.1. Indikacije za uzimanje krvi

Indikacija za uzimanje krvi je infekcija krvi. Krv za mikrobiološku dijagnostiku se može uzeti i kod drugih indikacija (Tabela 3) (23-25).

Tabela 3. Indikacije za uzimanje krvi za mikrobiološku dijagnostiku.

Stanje	Napomene
Febrilna neutropenija	
Groznica	
Suspektna endovaskularna infekcija, uključujući infekcije povezane sa centralnom linijom	
Suspektni infektivni endokarditis	
Holangitis Komplikovana pneumonija Komplikovane infekcije kože i mekih tkiva Meningitis Osteomijelitis Pijelonefritis Septički artritis	Ovi sindromi su često povezani sa bakterijemijom. Infekcije kože i mekih tkiva uključuju opekotine, ujedne rane, piomiozitis, gangrenu, nekrotizirajući fascitis i mionekrozu.
Neuobičajena leukocitoza	

Krv treba uzeti:

1. što je pre moguće nakon pojave kliničkih simptoma,
2. idealno, pre primene antimikrobne terapije; ako je pacijent već na antimikrobnoj terapiji, oporavak mikroorganizama se može postići ako se uzorak krvi uzme pre primene sledeće doze ili promene antimikrobnog leka, i inokuliše u bočicu za hemokulturu koja sadrži specijalizovane antimikrobne medijume za neutralizaciju (videti poglavlje 4.1.1.) (26).

Kada su utvrđene indikacije, klinički lekar izdaje zahtev za uzimanje krvi za hemokulturu odnosno mikrobiološku dijagnostiku (u određenim slučajevima, savremena mikrobiološka dijagnostika ima mogućnost direktne detekcije mikroorganizma u krvi, bez prethodnog koraka obogaćivanja krvi u bujonu u bočici za hemokulturu) (videti poglavlje 4.7.) (23,27).

3.2. Uzimanje krvi

Uzorkovanje krvi je najznačajniji korak u mikrobiološkoj dijagnostici infekcije krvi. Od kvaliteta ovog postupka zavisi tačnost i pouzdanost mikrobiološkog ispitivanja, i manja je verovatnoća dobijanja lažno pozitivnog ili lažno negativnog rezultata. Zbog toga je preporučena kontinuirana edukacija i periodična provera znanja i veština kod medicinskih radnika (klinički lekari i medicinske sestre). Dugo se smatralo da je vreme uzimanje krvi za hemokulturu (skok temperature kod pacijenta) najbitnije. Međutim, danas se zna da su najznačajniji parametri u mikrobiološkoj dijagnostici sepe: volumen krvi i broj uzetih uzoraka krvi (23,28).

3.2.1. Volumen krvi

Optimalan oporavak bakterija i gljiva iz krvi zavisi od kultivisanja adekvatnog volumena krvi (29,30). Kod većine odraslih pacijenata za vreme bakterijemije ili fungemije u krvi je prisutan mali broj bakterija odnosno gljiva (< 1 CFU/mL). Uzorkovanje dovoljne zapremine krvi poboljšava detekciju patogenih mikroorganizama prisutnih u niskoj koncentraciji. Ako volumen krvi nije optimalan, može se dobiti lažno negativan rezultat (31).

Stoga, volumen krvi koji se uzorkuje za svaki set hemokultura je najznačajnija varijabla za detekciju mikroorganizama odnosno pozitivnih hemokultura kod pacijenta sa infekcijom krvi.

Bočice za hemokulturu su dizajnirane da prime preporučeni volumen krvi da bi odnos krvi i bujona u bočicama bio optimalan (1:5 do 1:10) (32). Određene komercijalne bočice za hemokulturu mogu podržavati i manji odnos krvi i bujona ($< 1:5$) zbog dodatka natrijum polianetol sulfonata (engl. Sodium Polyanethol Sulfonate, SPS) koji inaktivira inhibitorne supstance prisutne u krvi (33).

Volumen krvi koji se uzima od pacijenta zavisi od uzrasta (odrasli i deca).

3.2.1.1. Odrasli pacijenti

Preporučeni volumen krvi koji treba uzeti kod odraslih pacijenata pri jednoj venepunkciji je 20-30 ml krvi (23,28).

Set hemokultura se sastoji od svih bočica inokulisanih pri jednoj venepunkciji. Volumen krvi izvađen pri jednoj venepunkciji se podjednako raspoređuje u bočice koje čine set. Pošto svaki set za hemokulturu najčešće sadrži aerobnu i anaerobnu bočicu, u svaku bočicu treba inokulisati približno 10 ml krvi (31). Ovaj volumen je preporučen radi optimizacije oporavka patogena kada je broj bakterija/gljiva manji od 1 CFU/ml krvi. Ako su kod pacijenta utvrđeni faktori rizika za gljivičnu infekciju, određeni proizvođači preporučuju da se setu doda i bočica za hemokulturu za kultivisanje gljiva (videti poglavlje 4.1.1.) (23,27).

Ako se anaerobna bočica ne koristi (trenutni nedostatak, jasno opravdanje), uvek je treba zameniti dodatnom aerobnom bočicom kako bi se osigurao dovoljan volumen krvi za kultivisanje (23).

Volumen krvi koji je inokulisan u bočicu redovno treba pratiti i o tome obavestavati medicinsko osoblje koje vadi krv za hemokulturu. Dodatnu edukaciju treba organizovati za medicinsko osoblje kod kojih se primeti kontinuitet u grešci (videti poglavlja 8.5. i 8.7.1.).

Nekoliko proizvođača automatizovanih sistema za kontinuirano praćenje hemokultura je razvilo softver koji automatizovano prati i obaveštava o volumenu krvi koji je zasejan u bočicu za hemokulturu (videti poglavlje 4.1.).

3.2.1.2. Deca

Optimalni volumen krvi koji treba uzeti kod odojčadi i dece je manji nego kod odraslih pacijenata, međutim, dostupni podaci ukazuju da prinos mikroorganizama takođe raste u direktnoj proporciji sa volumenom kultivisane krvi (23,27).

Kod dece uzimanje krvi za hemokulturu predstavlja izazov zbog poteškoća u određivanju optimalnog ukupnog volumena, zbog čega se mnogobrojne preporuke trenutno veoma razlikuju. Brojne studije su pokazale da je kod dece koncentracija mikroorganizama u krvi za vreme bakterijemije/fungemije obično veća nego kod odraslih, međutim mogući su i slučajevi infekcija krvi kod dece sa izuzetno malom koncentracijom mikroorganizama u krvi (23,30).

Preporučeni volumen krvi može da bude zasnovan na telesnoj masi pacijenta (Tabela 4) ili uzrastu pacijenta, sa tim da najveći broj međunarodnih vodiča i smernica preporučuje telesnu masu kao kriterijum (23,34). Takođe, medicinsko osoblje u svakom pojedinačnom slučaju treba da razmotri koji je to maksimalni volumen krvi koji se može uzeti detetu, i da on ne bude veći od 1-4% ukupnog volumena krvi (34).

Specijalno formulisane pedijatrijske bočice za hemokulturu su komercijalno dostupne za upotrebu kod dece manje telesne mase (videti poglavlje 4.1.1.) i preporučeni volumen krvi je do 4 ml (Napomena: pedijatrijske bočice nekih proizvođača su validirane i za volumen krvi od 0,5 ml) (23,27). Posebno su dizajnirane da podržavaju uobičajeni odnos krvi i bujona (1:5 do 1:10) sa manjom količinom krvi (27).

Tabela 4. Preporučeni volumen krvi u zavisnosti od telesne mase pedijatrijskog bolesnika.

Telesna masa pacijenta	Ukupni volumen cirkulišuće krvi	Ukupni volumen uzete krvi	Volumen krvi iz svake punkcije		Bočica/e	% ukupnog volumena uzete krvi
			Uzorak 1	Uzorak 2		
≤ 1 kg	50 – 99 ml	1 – 1,5 ml	1 – 1,5 ml	-	pedijatrijska	4%
1,1 – 2 kg	100 – 200 ml	4 ml	2 ml	2 ml	pedijatrijska	4%
2,1 – 12,7 kg	> 200 ml	6 ml	4 ml	2 ml	pedijatrijska	3%
12,8 – 36,3 kg	> 800 ml	20 ml	10 ml	10 ml	aerobna	2,5%
> 36,3 kg	> 2200 ml	40 – 60 ml	20 – 30 ml	20 – 30 ml	aerobna + anaerobna *	1,8 – 2,7%

* Mogućnost za dodatne bočice (videti poglavlje 4.1.1.).

Kod dece veće telesne mase, treba koristiti aerobnu bočicu, osim ako se ne sumnja na infekciju izazvanu anaerobnim mikroorganizmima (novorođenčad majki sa rupturom plodovih ovojnica, horioamnionitis, pedijatrijski pacijenti sa hroničnim oralnim infekcijama ili infekcijama sinusa, celulitis, abdominalne infekcije, ujedne rane, septički flebitis, neutropeniju koja je lečena kortikosteroidima, i drugo) (23).

3.2.2. Broj uzoraka (broj setova hemokultura)

Preporučuje se uzorkovanje krvi za dva, ili po mogućnosti tri seta hemokultura za svaku septičnu epizodu (dva do tri uzorka krvi), sledeći preporuke o poželjnom volumenu krvi (32).

Jedna bočica ili jedan set za hemokulturu kod odraslih pacijenata nije dovoljan za mikrobiološku dijagnostiku infekcije krvi i značajan broj bakterijemija/fungemija se može propustiti. Jedna bočica ili jedan set hemokultura mogu biti pozitivni i kod kontaminacije, za razliku od infekcije krvi, u kojoj je više bočica/setova pozitivno (23).

Ako se uzmu dva do tri seta i hemokulture su negativne nakon 24-48 sati inkubacije, a pacijent je i dalje potencijalno septičan, može se uzeti krv za dodatna dva do tri seta hemokultura (32).

3.2.2.1. Koju bočicu u setu za hemokulturu treba prvo inokulisati?

Ako se koristi tzv. leptir sistem set za uzimanje krvi sa integrisanim holderom, prvo treba inokulisati aerobnu bočicu da bi se sprečio prenos vazduha iz uređaja u anaerobnu bočicu. Ako se koriste igla i špric, prvo inokulisati anaerobnu bočicu.

Ako je količina izvađene krvi manja od preporučenog volumena (videti poglavlje 3.2.1.), onda u aerobnu bočicu prvo treba inokulisati približno 10 ml krvi, pošto je u većini slučajeva infekcija krvi izazvana aerobnim mikroorganizmima. Preostala količina krvi bi zatim trebalo da se inokuliše u anaerobnu bočicu (33).

3.2.3. Vreme i mesto uzimanja krvi

Većina vodiča i smernica navodi uzimanje krvi u vreme ili oko vremena porasta temperature kod pacijenata sa utvrđenim indikacijama za uzimanje krvi uz preporučeni vremenski interval između dva uzorkovanja krvi za hemokulturu od 30 do 60 minuta (23,28). Međutim, pokazano je da uzimanje krvi kada pacijent ima skokove temperature ne utiče značajno na dobijanje pozitivnih hemokultura, kao i da vremenski interval između uzimanja dva uzorka krvi se ne smatra kritičnim faktorom za mikrobiološku dijagnostiku. Sa druge strane, značajno je da uzimanje krvi za hemokulturu bude pre primene antimikrobnog leka ili neposredno pre sledeće doze ili promene antimikrobnog leka (29).

Venepunkcija je jedina adekvatna metoda za uzimanje krvi za hemokulturu (23). Nije preporučeno da se krv uzima iz arterije, osim u izuzetnim slučajevima kada je stanje pacijenta takvo da nije moguće izvaditi krv iz periferne vene (27). Uzimanje krvi iz intravaskularnog katetera takođe

se ne preporučuje jer značajno povećava učestalost kultivisanja kontaminanata. Krv za hemokulturu se može uzeti iz intravaskularnog katetera samo ako je istovremeno uzeta i krv iz periferne vene, što je naročito važno pri sumnji na infekciju krvi povezanu sa intravaskularnim kateterom (videti poglavlje 7.1.) (35).

Krv za hemokulturu potrebno je uzeti iz dve različite punkcije („dve različite periferne vene“). Postoje preporuke za uzimanje krvi jednom venepunkcijom, ali u tom slučaju se uzima krv za jedan set hemokultura koji sadrži četiri do šest bočica (36).

Kod sumnje na endokarditis potrebno je uzeti tri seta hemokultura i uzorkovanje se može rasporediti proizvoljno tokom 24 sata (videti poglavlje 7.2.).

Kod sumnje na gljivičnu infekciju krvi preporučuje se uzeti dva do tri seta hemokultura pri čemu se u setu uz aerobnu i anaerobnu bočicu može dodati i treća bočica posebno namenjena uspešnijem porastu gljiva (videti poglavlje 4.1.1. i poglavlje 7.3.).

3.2.4. Vađenje krvi

Procedura vađenja krvi uključuje sledeće:

1. Pripremu prostorije: prozori i vrata u prostoriji u kojoj se vadi krv treba da budu zatvoreni; osoba koja vadi krv treba da ima slobodan pristup pacijentu tokom uzimanja uzorka; set za uzimanje krvi kao i kontejner za iskorišćeni medicinski otpad treba da bude stavljen blizu osobe koja vadi krv.

2. Pripremu seta za uzimanje krvi: set treba da sadrži jednokratne rukavice (nesterilne); zatvoreni sistem za vađenje krvi za bočicu za hemokulturu (igle sa leptirićem i poseban adapter za bočice) ili otvoreni sistem za vađenje krvi (igla i špric)*; bočice za hemokulturu; antiseptik za kožu; dezinficijens za čep bočice; sterilne jastučiće od gaze; povescu; flaster sa oblogom; kontejner za iskorišćeni medicinski otpad.

* Uzimanje krvi iglom i špricom u otvorenom sistemu povezano je sa visokim rizikom od kontaminacije uzorka i nehotičnim ubodom osoblja. Ako se krv uzima na ovaj način, prvo inokulisati anaerobnu bočicu za hemokulturu.

3. Popunjavanje uputa za laboratoriju: mora biti navedeno ime i prezime pacijenta, datum i vreme vađenja krvi, identifikacioni broj pacijenta, odeljenje, analiza koja se traži, mesto uzorkovanja (npr. leva ili desna ruka), broj seta (npr. set 1), ime/identifikacija osobe koja je vadila krv i druge informacije koje se procene značajnim.

4. Pripremu osoblja: a) dezinfekcija ruku (oprati ruke sapunom i vodom, osušiti, a zatim dezinfikovati sredstvom koje sadrži alkohol), b) upotreba nesterilnih rukavica (navući rukavice nakon sušenja dezinficijensa).

5. Pripremu pacijenta: potvrditi identitet pacijenta; pacijent treba da leži ili stabilno sedi tokom uzorkovanja; ako se uzorak krvi direktno inokuliše u bočicu (zatvoreni sistem) položaj pacijenta treba da bude takav da bočice za hemokulturu budu ispod nivoa pacijentove ruke tokom vađenja krvi; ako je pacijent malo dete ili novorođenče, ne sme se vaditi krv bez pomoći druge osobe.

6. Dezinfekciju čepa bočice za hemokulturu: čep je potrebno dezinfikovati 70% alkoholom ili hlorheksidinom pre vađenja krvi i posle inokulacije krvi u bočicu.

7. Izbor ubodnog mesta: krv treba uzeti iz dve periferne vene, samo u slučajevima kada to nije moguće treba izvaditi arterijsku krv.

8. Dezinfekciju ubodnog mesta: za dezinfekciju koristiti tinkturu joda, povidon jod, 2% hlorheksidin glukonat (CHG) u 70% izopropil alkoholu (IPA), CHI/IPA ili 70% alkohol (da ispolje antiseptički efekat, tinktura joda CHG/IPA zahteva vreme od 30 s, a povidon-jod 1,5 do 2 min). Napomena: kod dece mlađe od dva meseca, za dezinfekciju se preporučuju povidon-jod i alkohol.

9. Vađenje krvi, inokulacija u bočice za hemokulturu i dezinfekciju čepa bočice za hemokulturu.

10. Obeležavanje bočice za hemokulturu: na bočici mora biti naznačeno ime i prezime pacijenta, identifikacioni broj pacijenta, datum i vreme vađenja krvi i ime/identifikacija osobe koja je vadila krv (može biti na samoj bočici i/ili na uputnici).

Redosled aktivnosti kod vađenja krvi prikazan je na Dijagramu 2.



Dijagram 2. Koraci u proceduri vađenja krvi za hemokulturu.

3.3. Transport

Bočice za hemokulturu potrebno je dostaviti što pre (u roku od dva do četiri sata) u mikrobiološku laboratoriju, odnosno, što pre staviti u uređaj za inkubaciju hemokultura, koji se može nalaziti i izvan laboratorije. Ukoliko to nije moguće, potrebno je inokulisane bočice do stavljanja u uređaj čuvati na sobnoj temperaturi u periodu koji preporučuje proizvođač bočica (bioMérieux do 24 h, BD zavisno od vrste bočica do 48 h bez prethodne inkubacije). Bočice za hemokulturu se ne smeju čuvati u frižideru na temperaturi od 4°C.

3.4. Prijem u mikrobiološku laboratoriju

Ovu etapu mikrobiološke dijagnostike, kao i bilo koje druge analize, treba započeti kontrolom kvaliteta prethodnih aktivnosti. Pre bilo kakvih laboratorijskih postupaka, proverite da li je:

- odgovarajuća uputnica sa svim potrebnim podacima priložena uz bočicu za hemokulturu,
- bočice za hemokulturu su neoštećene i pravilno obeležene sa vidljivim bar kodovima (ako postoje na bočici),
- podaci na bočicama za hemokulturu i uputnici se podudaraju,
- svaka bočica za hemokulturu sadrži odgovarajući volumen krvi koji zahteva proizvođač,
- izgled sadržaja bočica za hemokulturu nije sumnjiv.

Ako su svi zahtevi zadovoljeni, analizu je potrebno prihvatiti, a bočice odmah postaviti u uređaj za inkubaciju (automatizovanu ili manuelnu). Na svaki radni list treba staviti inicijale osobe koja je izvela prethodno navedene aktivnosti, kao potvrdu da je bočica pregledana na prijemu.

Kriterijumi za odbacivanje inokulisanih bočica za hemokulturu su: a) neobeležene bočice, b) razbijene i oštećene bočice, c) bočice koje propuštaju (cure).

4. ANALITIČKA FAZA

Analitička faza mikrobiološke dijagnostike infekcije krvi započinje stavljanjem bočica za hemokulturu u inkubator.

Bočice za hemokulturu se smatraju pozitivnim i pre stavljanja u inkubator ako sadržaj pokazuje znakove hemolize, zamućenosti, povišenog pritiska (ispupčeni gumeni čep), ako je senzor na dnu bočice promijenjene boje (bioMérieux, Francuska), krv boje čokolade, lizirana i/ili vrlo tamna krv (Beckton, Dickinson and Company, SAD) (23,47). Kod takvih bočica treba odmah započeti mikrobiološku obradu i analizu (vidite poglavlje 4.3.).

4.1. Automatizovani sistemi za inkubaciju hemokultura

Primena automatizovanih sistema koji kontinuirano prate porast mikroorganizama u poređenju sa manuelnom obradom hemokultura povećala je uspešnost i brzinu detekcije rasta mikroorganizama u hemokulturi (48). Trenutno na tržištu postoji nekoliko ovih sistema i za svaki od sistema su dostupne bočice sa različitim medijumima (pogledati poglavlje 4.1.1.), dizajnirane da se u njima mikroorganizam što bolje oporavi.

Hemokultura je hitna analiza i bočice za hemokulturu se moraju staviti u uređaj za inkubaciju hemokultura unutar 30 minuta od prijema u laboratoriju.

Većina sistema za kontinuirano praćenje hemokultura vrši detekciju porasta proizvodnje CO_2 kao rezultat metabolizma mikroorganizama (23). Najčešće se koriste Bact/ALERT (bioMérieux) i BD BACTEC™ (Becton, Dickinson and Company) sistemi. Na dnu bočice se nalazi senzor koji je membranom propustljivom za CO_2 odvojen od tečnog medijuma. Kako mikroorganizmi aktivnim metabolizmom proizvode CO_2 , on difunduje kroz membranu, istiskuje jone H_2 , dovodeći do acidifikacije senzora, što se detektuje kolorimetrijski ili fluorometrijski, zavisno od automatizovanog sistema. Fotoosetljiva dioda osvetljava senzor svakih 10 minuta, a reflektovanu svetlost hvata fotodetektor. Promena u intenzitetu signala je proporcionalna pomaku emisije boje senzora, koja je povezana sa količinom rastvorenog CO_2 u medijumu. Podaci se sakupljaju i prebacuju u kompjuter od aparata koji pomoću algoritama analizira podatke i prepoznaje porast proizvodnje CO_2 . Bočice koje zadovoljavaju kriterijum za značajan porast CO_2 automatizovani sistem prepoznaje i signalizira kao pozitivne. Uređaj šalje zvučni signal, a svetlosnim signalom locira mesto u aparatu na kojem se nalazi pozitivna bočica (23).

Inokulisane bočice za hemokulturu se inkubiraju maksimalno pet dana u automatizovanim sistemima, nakon čega se smatraju negativnim i uklanjaju se iz uređaja. Pozitivne bočice za hemokulturu se podvrgavaju daljoj mikrobiološkoj dijagnostici, a informaciju o pozitivnoj hemokulturi potrebno je odmah javiti medicinskom osoblju na odeljenju sa kog je poslata hemokultura (47).

Ako na kraju inkubacije od pet dana negativna bočica izgleda pozitivno na temelju vizuelnog pregleda, treba pretpostaviti da je hemokultura pozitivna i pristupiti daljoj obradi (pogledati poglavlje 4.3.).

Savremeni sistemi za inkubaciju bočica za hemokulturu su značajno skratili vreme čekanja na rezultat. Pored toga, korišćenje automatizovanih sistema za kontinuirano praćenje otkriva epizode endokarditisa i drugih infekcija krvi unutar pet dana inkubacije. Stoga, nema potrebe za produžavanjem vremena inkubacije u slučaju sumnje na infekciju zahtevnim, probirljivim mikroorganizmima (23,47,48).

Potreba za skraćivanjem vremena čekanja na rezultat motivisala je proizvođače automatizovanih sistema da pojednostave rad opisanih uređaja. Dostupni su potpuno automatizovani sistemi (BACT/ALERT® VIRTUO®, bioMérieux) koji sami očitavaju kodove sa bočica, dodeljuju im poziciju u uređaju i do nje transportuju bočicu automatizovano. Na ovaj način je moguće da bilo koja osoba stavi bočicu u aparat, čime se skraćuje vreme do dobijanja rezultata. Nakon signaliziranja pozitivne bočice ili nakon završetka inkubacije od pet dana, aparat automatski uklanja bočice, postavljajući ih u odgovarajući

rezervoar: za odlaganje (negativne hemokulture) ili dalju dijagnostiku (pozitivne hemokulture). Pored toga, prednost ovog sistema je detekcija nivoa krvi u bočicama (inokulisan volumen krvi u bočicu za hemokulturu) (49).

Satelitski sistemi za inkubaciju hemokultura sa uparenim softverom (BD BACTECTM FX40 satelitska jedinica sa BD SynapsysTM softverom, Becton, Dickinson and Company) izuzetno su inovativno i efikasno rešenje. Ukratko, sistem se bazira na kontinuiranoj softverskoj komunikaciji između glavne laboratorije i malog aparata za inkubaciju hemokultura koji se nalazi na bolničkom odeljenju, npr. jedinici intenzivnog lečenja. Ovako postavljen satelitski sistem omogućava da se bočica za hemokulturu stavi u uređaj odmah nakon uzorkovanja i inokulacije, čak i nakon radnog vremena mikrobiološke laboratorije. Prednost ove vrste uređaja je što bilo koja osoba sa odeljenja može staviti bočicu u mali instrument kako bi inkubacija započela što pre već na tom odeljenju, uz istovremeno kontinuirano lokalno praćenje bočice i kroz aparat i kroz softver. Bočice za hemokulturu iz malih aparata smeštenih na odeljenjima se zatim mogu izvaditi i prebaciti u glavnu mikrobiološku laboratoriju gde se te bočice mogu ili nastaviti inkubirati (ako je protokol još u toku) u automatizovanom sistemu u glavnoj laboratoriji, ili se mogu odmah dalje obrađivati ako su već bile pozitivne na satelitskoj lokaciji. Zbog značajnog skraćivanja vremena obrade (50), značajnog poboljšanja kod skraćivanja vremena do rezultata i kvaliteta samih rezultata, treba razmotriti ovu vrstu rešenja, pogotovo za one laboratorije koji ne mogu raditi svakog dana tokom cele godine (51).

4.1.1. Vrste bočica za hemokulturu

Medijum za kultivisanje krvi mora biti:

- dovoljno osetljiv da se u njemu oporavi: a) širok spektar klinički relevantnih mikroorganizama i b) mikroorganizmi koji oslobađaju male količine CO₂,
- pogodan za različite vrste uzoraka (krv od odraslih pacijenata i od dece, od pacijenata koji primaju antimikrobnu terapiju, za telesne tečnosti, i drugo) (47).

Komercijalne bočice za hemokulturu sadrže specifičnu formulaciju medijuma koji omogućavaju kultivisanje aerobnih, anaerobnih, fakultativno anaerobnih, mikroaerofilnih, kapnoičnih bakterija i gljiva, u zavisnosti od sastava i namene bočica (52-55). Nekoliko velikih, dobro kontrolisanih kliničkih studija koje su poredile različite sisteme i medijume, pokazale su da velika većina radi dijagnostički zadovoljavajuće, a izdvajaju se bočice proizvođača Becton, Dickinson and Company i bioMérieux. Sve formulacije medijuma koje su dostupne na tržištu sadrže antikoagulanse. Najefikasniji je SPS koji dodatno neutrališe lizozime, inhibira fagocitozu, inaktivira neke aminoglikozide i inhibira deo kaskade komplementa. Razblaživanje krvi u bujonu (odnos krv i bujon – 1:5 do 1:10) u bočicama, kao i SPS, imaju inhibitorni efekat prema antimikrobnim agensima koji mogu biti prisutni u krvi odnosno hemokulturi. Pored toga, neki proizvođači dodaju u medijum i apsorbujuća sredstva ili antibiotik-vezujuće supstance, smole u cilju inaktivacije antimikrobnih lekova. Dodatno, neki medijumi sadrže litičke agense koji su značajni za oslobađanje fagocitovanih mikroorganizama.

U cilju optimizacije oporavka svih potencijalnih patogena neophodno je kombinovati komplementarne medijume (različite bočice za hemokulturu) (23).

Bočica za hemokulturu za kultivisanje aerobnih mikroorganizama

a) Standardna

Bočica sadrži obogaćenu hranjivu podlogu. Supstrat je namenjen za rast aerobnih bakterija i gljiva.

b) Sa sredstvom za inaktivaciju antimikrobnih lekova

Bočica sadrži obogaćenu hranjivu podlogu uz dodatak sredstva za inaktivaciju antimikrobnih lekova. Omogućava rast aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija i gljiva u uzorcima krvi uzetim tokom

primene antimikrobne terapije. Zbog većeg analitičkog prinosa i inaktivacije antimikrobnih lekova, ova bočica se preporučuje za upotrebu u osnovnom setu bočica za hemokulturu.

Bočica za hemokulturu za kultivisanje anaerobnih mikroorganizama

a) Standardna

Bočica sadrži obogaćenu hranljivu podlogu sa prethodno redukovanim CO₂ i N₂. Namenjena je za rast anaerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija.

b) Litička

Bočica sadrži obogaćenu hranljivu podlogu sa prethodno redukovanim CO₂ i N₂ uz dodatak saponina, faktora koji lizira krvne ćelije. Sredstvo za lizu omogućava oslobađanje intracelularnih patogena, te povećava analitički prinos mikroorganizama iz uzorka. Hranljiva podloga omogućava rast ne samo anaerobnih, već i mikroaerofilnih i fakultativno anaerobnih bakterija. Zbog uspešnog rasta i boljeg analitičkog prinosa mnogih patogena u poređenju sa standardnom anaerobnom hranljivom podlogom, preporučuje se korišćenje litičke hranljive podloge u osnovnom setu bočica za hemokulturu.

c) Sa sredstvom za inaktivaciju antimikrobnih lekova

Bočica sadrži obogaćenu hranljivu podlogu sa prethodno redukovanim CO₂ i N₂ uz dodatak sredstva za inaktivaciju antimikrobnih lekova. Hranljiva podloga omogućava rast anaerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija u uzorcima uzetim tokom antimikrobne terapije. Zbog većeg analitičkog prinosa i inaktivacije antimikrobnih lekova, ova bočica se preporučuje za upotrebu u osnovnom setu bočica za hemokulturu.

Pedijatrijska bočica za hemokulturu

Bočica omogućava uzimanje manjeg volumena krvi uz istovremeno održavanje željene dijagnostičke vrednosti. Namenjena je za pedijatrijske pacijente sa telesnom masom manjom od 12,8 kg. Sadrži obogaćenu hranljivu podlogu uz dodatak sredstva za inaktivaciju antimikrobnih lekova. Omogućava rast aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija i gljiva.

Bočica za hemokulturu za kultivisanje gljiva

Bočica sadrži selektivnu hranljivu podlogu koja podržava porast gljiva, antibiotike koji inhibiraju rast bakterija i saponin koji omogućava lizu ćelija. Ako se sumnja na gljivičnu etiologiju infekcije, ili ako se radi o visokorizičnom pacijentu (imunokompromitovanom, neutropeničnom) preporučuje se uzeti u obzir korišćenje hranljive podloge za kulturu gljiva i dodati je setu za hemokulturu kako bi se skratilo vreme do dobijanja rezultata. U tom slučaju, set za hemokulturu se sastoji od ukupno tri bočice (56).

4.2. Manuelno obrađivanje hemokultura

Pre pojave sistema za automatizovanu inkubaciju, hemokulture su se obrađivale manuelno, što će biti opisano u ovom poglavlju za slučaj kada automatizovani sistem možda privremeno neće biti dostupan (servis, zamena, i drugo).

Na tržištu postoje bočice za manuelnu obradu hemokultura različitih sastava i brojnih proizvođača. Ukoliko se primenjuje ova metoda za mikrobiološku dijagnostiku infekcije krvi treba se pridržavati uputstva proizvođača. Preporuka je da se koriste medijumi različitog sastava (različite bočice za hemokulturu; preporučeno aerobna i anaerobna) da bi se optimizovao oporavak mikroorganizama u hemokulturi (23,57).

Nakon inokulacije krvi, bočice se inkubiraju u termostatu na 35-37°C tokom sedam dana, pri čemu se dnevno vizuelno ispituje prisustvo znakova rasta mikroorganizama u svakoj bočici (57). Međutim, sporo-rastući i probirljivi mikroorganizmi zahtevaju inkubaciju dužu od sedam dana (značajna razlika u odnosu na automatizovane sisteme) (58).

Promene koje ukazuju na rast mikroorganizama u hemokulturi su zamućenje, hemoliza, promena boje, proizvodnja gasa i drugo (Tabela 5) (47).

Tabela 5. Vidljivi znaci porasta mikroorganizama u bočici za hemokulturu za manuelnu obradu.

Makroskopska opservacija	Mogući mikroorganizmi
Hemoliza	Streptokoke, stafilokoke, <i>Listeria</i> spp., <i>Clostridioides</i> spp., <i>Bacillus</i> spp.
Zamućenost	Aerobni Gram-negativni bacili, stafilokoke, <i>Bacteroides</i> spp.
Formiranje gasa	Aerobni Gram-negativni bacili, anaerobi
Formiranje pelikula	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., gljive
Zgrušavanje	<i>Staphylococcus aureus</i>
Vidljive kolonije	Streptokoke, stafilokoke

Ukoliko je bočica pri vizuelnoj inspekciji makroskopski pozitivna, procesuiru se kao što je opisano u poglavlju 4.3.

U smernicama i vodičima dobre laboratorijske prakse navodi se da sadržaj negativne bočice za hemokulturu za manuelnu obradu ne treba subkultivisati (23,47). Svaka laboratorija u skladu sa svojom praksom, te u skladu sa lokalnim zakonima, smernicama i programima kvaliteta koji se sprovode u laboratoriji treba da ima pisanu proceduru kako postupati u ovoj situaciji.

4.3. Postupak sa pozitivnom bočicom za hemokulturu

Pre presejavanja i dalje obrade pozitivne bočice za hemokulturu, potrebno je posebnu pažnju posvetiti bezbednosti laboratorijskog osoblja. Treba biti oprezan kada se uzima sadržaj iz pozitivne bočice za hemokulturu, zbog čega se preporučuje obrada u laminarnoj komori. Osoblje treba da nosi ličnu zaštitnu opremu (mantil, rukavice, naočare ili kacigu) (47).

Sadržaj (tečnu kulturu) iz bočice je potrebno izvući sterilnom iglom i špricom. Postupak je sledeći:

- postaviti bočicu uspravno, dezinfikovati čep 70% alkoholom i ostaviti da se osuši na vazduhu,
- zbog mogućeg prisustva povećanog pritiska u bočici, pažljivo staviti sterilnu iglu vertikalno kako bi se uklonio višak gasa,
- nakon smanjenja pritiska u bočici, odmah pričvrstiti sterilni špric i izvući 4 ml tečne kulture,
- preneti, kap po kap, na odabrane hranljive podloge (Tabela 6) i na sterilno predmetno staklo za preparat koji se boji po Gramu. U zavisnosti od kapaciteta mikrobiološke laboratorije i validiranih metoda, tečna kultura se može koristiti za direktnu identifikaciju mikroorganizma iz pozitivne bočice i direktni, brzi antibiogram (59,60).

Radi veće bezbednosti laboratorijskog osoblja, preporučuje se korišćenje posebnih zatvarača na bočicama, koji omogućavaju aplikaciju kulture iz pozitivne bočice bez upotrebe igle i šprica (23).

Nakon ovog postupka, kontaminirane materijale treba staviti u posudu za odlaganje infektivnog otpada, a pozitivnu bočicu treba čuvati na sobnoj temperaturi do završetka dijagnostičkog postupka (23,47).

U retkim slučajevima, automatizovani sistem može proglasiti hemokulturu pozitivnom, ali da mikroskopski nalaz i subkultura budu negativni. U ovom slučaju je važno pogledati krivulju rasta bočice i zatražiti dodatno presejavanje pre nego što se bočica proglasi lažno pozitivnom. Uzroci lažno pozitivnog rezultata mogu uključivati probleme sa opremom, volumen krvi veći od preporučenog, krv sa velikim brojem leukocita i drugo.

4.4. Preparat iz hemokulture obojen po Gramu

Samo iz pozitivnih bočica za hemokulturu, koje su detektovane vizuelnom inspekcijom (manuelna obrada hemokultura) ili u automatizovanom sistemu, pravi se preparat (47).

Pravljenje i mikroskopski pregled preparata iz hemokulture obojenog po Gramu i izveštavanje nadležnog zdravstvenog radnika na odeljenju gde je pacijent hospitalizovan treba da se izvrši unutar 60 minuta od detekcije pozitivne hemokulture (61). Kašnjenje u ovoj aktivnosti može uticati na ishod lečenja pacijenta sa pozitivnom hemokulturom. Ovo nije moguće u laboratorijama koje ne rade svakog dana tokom cele godine, kojima se predlaže da obuče laboratorijsko osoblje za izvođenje ove analize i izveštavanje. Zbog toga je od izuzetnog značaja kontinuirana edukacija i periodična evaluacija znanja i praktičnih veština kod laboratorijskih radnika. Stoga, izveštavanje „pozitivna hemokultura“ bez rezultata pregleda preparata obojenog po Gramu nije prihvatljivo (23).

Brze, kultura-nezavisne metode koje su danas u primeni značajno su skratile vreme identifikacije i testiranja antimikrobne osetljivosti patogena iz pozitivne hemokulture. Međutim, ovi testovi i metode ne zamenjuju preparat obojen po Gramu iz pozitivne hemokulture.

Izveštaj rezultata pregleda preparata obojenog po Gramu treba da sadrži:

1. Gram reakciju (Gram-pozitivan, Gram-negativan, Gram-varijabilan)
2. Oblik (koke, bacili, kokobacili, pleomorfni, filamentozni, blastokonidije, hife, i drugi)
3. Raspored (pojedinačni, parovi, lanci, grupe/grozdovi, palisade, i drugo) (47).

4.5. Subkultivisanje

Subkultivisanje (presejavanje tečne kulture iz pozitivnih bočica za hemokulturu na čvrste hranljive podloge) je sastavni deo postupka obrade hemokultura.

Laboratorije bi trebale da imaju detaljan protokol za obradu hemokultura. Sve pozitivne bočice za hemokulturu (aerobne i anaerobne) treba da se subkultivšu na krvni agar sa 5% ovčije krvi i čokoladni agar, i da se inkubiraju na temperaturi od 35-37°C u prisustvu 5% CO₂ (47,62). Pozitivne anaerobne bočice treba subkultivisati na neselektivne anaerobne medijume obogaćene vitaminom K i heminom, i inkubirati anaerobno na temperaturi od 35-37°C. U zavisnosti od nalaza na preparatu iz hemokulture, treba dodati i druge medijume (Tabela 6) (47,63,64).

4.6. Identifikacija i testiranje antimikrobne osetljivosti

Procedure za identifikaciju i testiranje antimikrobne osetljivosti se ne razlikuju od onih koje se primenjuju kod izolata iz drugih uzoraka. Izvode se u skladu sa principima dobre laboratorijske prakse i standardnom operativnom procedurom. Pored ovih metoda, danas je u sve široj primeni brza mikrobiološka dijagnostika (identifikacija i testiranje antimikrobne osetljivosti).

4.6.1 Brze i automatizovane metode za identifikaciju direktno iz pozitivnih hemokultura

Za brzu identifikaciju bakterija i gljiva direktno iz pozitivne bočice za hemokulturu mogu se koristiti automatizovani sistemi za identifikaciju mikroorganizama i testiranje antimikrobne osetljivosti (BD Phoenix™ M50, Becton, Dickinson and Company; VITEK® 2, bioMérieux) (65-68).

Brza identifikacija bakterija i gljiva poraslih u hemokulturi moguća je primenom metode Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (69-71). Dva osnovna pristupa kojima se MALDI-TOF MS može primenjivati kako bi se ubrzala identifikacija mikroorganizama poraslih u hemokulturi su: a) identifikacija direktno iz pozitivne bočice za hemokulturu i b) identifikacija iz kratko inkubirane subkulture od nekoliko sati na čvrstoj hranljivoj podlozi. Prilikom direktne identifikacije iz bočice za hemokulturu, kulturu iz bočice potrebno je prethodno obraditi nekim od dostupnih protokola u svrhu ekstrakcije proteina koji omogućavaju identifikaciju u kratkom vremenskom roku. Identifikacija iz diskretnog porasta nakon kratke inkubacije subkulture na čvrstoj hranljivoj podlozi ne zahteva dodatnu pripremu.

Poslednjih nekoliko godina na tržištu postoje i drugi sistemi i tehnologije koje se mogu koristiti za direktnu identifikaciju patogena iz pozitivne hemokulture (Tabela 7) (23,72-80).

Tabela 6. Inicijalna obrada i preliminarno izveštavanje rezultata pozitivnih hemokultura.

Rezultat Gram preparata	KA	ČA	AN ^a	Druge podloge i testovi	Izveštaj
Pozitivne koke u grupama	X			nekoliko ^b kapi za koagulaza test u epruveti i AST	„Gram-pozitivne koke u grupama“; „Mogući <i>Staphylococcus</i> spp.“
Pozitivne koke u lancima ili parovima	X	X	X	nekoliko ^b kapi za bacitracinski, optohinski, CAMP test, žuč-eskulin podlogu i AST	„Gram-pozitivne koke u lancima, parovima“; „Mogući <i>Streptococcus</i> spp. ili „Mogući <i>Enterococcus</i> spp.“
Kratki pozitivni bacili	X	X	X	nekoliko ^b kapi za CAMP test, žuč-eskulin podlogu	„Gram-pozitivni bacili“
Dugi pozitivni bacili	X	X	X		„Gram-pozitivni bacili“; ako je samo anaerobna bočica pozitivna „Mogući anaerobni Gram-pozitivni bacili“
Negativni bacili	X	X	X	MC, AST, podloga za <i>Campylobacter</i> spp.	„Gram-negativni bacili“; ako morfologija ukazuje „Mogući <i>Campylobacter</i> spp. “ ili „Mogući <i>Haemophilus</i> spp. “
Negativne koke	X	x	x	Napomena: <i>Acinetobacter</i> spp. može da bude ovog oblika	„Gram-negativne koke“ ako je samo anaerobna bočica pozitivna „Moguće anaerobne Gram-negativne koke“
Gljive	X	X		SDA, CHROMagar	„Gljive“, ako morfologija ukazuje „Kvasnice“ ili „Plesni“

KA, Columbia agar sa 5% ovčije krvi, ČA, čokoladni agar; AN, anaerobna podloga; MC, MacConkey agar; SDA, Sabouraud deksatrozni agar; AST, antibiogram/antimikogram.

^aAko je pozitivna anaerobna bočica.

^bLaboratorija može da ima validirani protokol za izvođenje direktne konvencionalne identifikacije i antibiograma iz pozitivne bočice za hemokulturu.

Tabela 7. Tehnologije za identifikaciju mikroorganizama direktno iz pozitivne hemokulture.

Tehnologija	Prosečno vreme za dobijanje rezultata iz pozitivne hemokulture, sati	Primeri komercijalno dostupnih kitova/testova i platformi
FISH	0,5-1,5	Accelerate Pheno® System (Accelerate Diagnostics)
Nested PCR/FilmArray	1	BIOFIRE® BCID2 panel (bioMérieux) Xpert® MRSA/SA Blood Culture panel (Cepheid)
MALDI-TOF MS	1	VITEK® MS PRIME (bioMérieux) MALDI Biotyper® System (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG.)
DNK hibridizacija i elektrohemijaska detekcija	1,5	Luminex VERIGENE® (Diasorin) cobas® ePlex® BCID (Roche Diagnostics)
Real-time PCR i microarray	≈4,5	SepsiTest™-UMD (Molzym) eazyplex® BloodScreen (Amplex) Unyvero BCU panel (Curetis)

4.6.2. Fenotipsko testiranje antimikrobne osetljivosti

Svake godine Evropski komitet za testiranje antimikrobne osetljivosti (engl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) izdaje važeće Tabele kliničkih graničnih vrednosti za određivanje i tumačenje rezultata testiranja osetljivosti (81). Pored toga, na web stranici EUCAST-a dostupne su i preporuke kako testirati osetljivost na antimikrobne lekove za one mikroorganizme za koje nisu definisane ili nisu dostupne kliničke granične vrednosti za određivanje kategorije osetljivosti (S, I, R). Istovremeno, smernice američkog Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) stalno se ažuriraju, a njihovo korišćenje savetuje se ukoliko preporuke EUCAST-a nisu dostupne (82).

Postupci manuelne izrade antibiograma opisani su u dokumentima dostupnim na web stranici EUCAST-a. Izbor antimikrobnih lekova za testiranje treba da bude u korelaciji sa vrstom izolovanog patogena, primarnim izvorom infekcije (ako postoji) i farmakokinetikom antimikrobnog leka (lek sa dobrim sistemskim prodiranjem u organe).

Prema preporukama EUCAST-a, moguće je uraditi brzo testiranje antimikrobne osetljivosti direktno iz pozitivne hemokulture (engl. Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing, RAST) i u tom slučaju sadržaj bočice (tečnu kulturu) tretirati kao inokulum. Postupak izrade, očitavanja i tumačenja RAST metode opisani su na web stranici EUCAST-a.

Velika većina sistema za automatizovanu identifikaciju mikroorganizama koji su prisutni na tržištu opremljena je panelima za testiranje antimikrobne osetljivosti, što znači da je rezultat antibiograma dostupan istovremeno sa identifikacijom patogena (BD Phoenix™ M50, Becton, Dickinson and Company; VITEK® 2, bioMérieux). Takva rešenja značajno skraćuju vreme čekanja na rezultat (83-86).

Pored toga, moguće je uraditi testiranje antimikrobne osetljivosti u automatizovanom sistemu direktno iz pozitivne bočice za hemokulturu, kada se kultura iz bočice koristi kao inokulum. Trenutno na tržištu postoji nekoliko rešenja (VITEK® REVEAL™ - bioMérieux; Accelerate Pheno® System - Accelerate Diagnostics (distribuirano Becton, Dickinson and Company); dRAST™, QuantaMatrix Inc., Južna Koreja) za automatizovani, brzi i direktni antibiogram iz pozitivne hemokulture (fenotipski antibiogram za četiri do šest sati) sa mogućnošću tumačenja i interpretacije antibiograma prema važećem standardu (EUCAST, CLSI) (87-90).

4.6.3. Molekularni antibiogram – detekcija gena rezistencije

Molekularni ili genotipski antibiogram se zasniva na detekciji gena rezistencije kod uzročnika infekcije. Postoje brojni komercijalni sistemi koji pored direktne detekcije i identifikacije bakterija i gljiva iz pozitivne hemokulture detektuju i čitav spektar gena povezanih sa antimikrobnom rezistencijom kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, i gljiva. Detekcija gena rezistencije skraćuje vreme izveštavanja. Brojne studije su pokazale odlično slaganje između detekcije gena rezistencije i konvencionalnog, fenotipskog antibiograma (91-94).

Dva najčešća targeta kod Gram-pozitivnih bakterija su *mecA/C* geni za detekciju *mecA/C*-posredovane meticilinske rezistencije kod stafilokoka i *vanA/B* geni za detekciju vankomicinske rezistencije kod enterokoka. Različiti komercijalni paneli takođe detektuju gene rezistencije specifične za Gram-negativne bakterije, najčešće *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48-like}.

U većini slučajeva, detekcija *mecA/C* ili *vanA/B* gena omogućava krajnju interpretaciju molekularnog antibiograma i antimikrobna terapija se može optimizovati u skladu sa prisustvom ili odsustvom gena. Na primer, ako *mecA/C* gen nije detektovan kod *Staphylococcus aureus*, vankomicin se može de-eskalirati. Izuzetno retko, meticilinska rezistencija kod stafilokoka može biti posredovana drugim mehanizmima rezistencije (23). Potrebno je imati u vidu da se tehničke greške dešavaju povremeno kao

i kod fenotipskog antibiograma. Kod Gram-negativnih bakterija, zbog postojanja brojnih i različitih mehanizama rezistencije na isti antimikrobni lek, odsustvo gena rezistencije ne predviđa osetljivost na antimikrobni lek. Ovi markeri mogu biti neekspimirani ili ekspimirani na niskom nivou koji se ne detektuje kao klinička rezistencija (23). Zbog toga treba pažljivo tumačiti i interpretirati molekularne antibiogramе. U skladu sa tim, mikrobiološke laboratorije koje izvode molekularni antibiogram iz pozitivne bočice za hemokulturu treba da imaju standardizovani protokol koji će osigurati konzistentnost interpretacije rezultata molekularnog antibiograma i rešiti diskrepance između rezultata genotipskog i fenotipskog antibiograma. Ovi protokoli mogu da uključe ponovljeno i/ili dodatno testiranje.

4.7. Direktna detekcija uzročnika u krvi

Direktna detekcija patogena u uzorcima krvi odnosi se na metode i tehnologije koje ne koriste hemokulturu kao korak u procesu obogaćivanja rasta mikroorganizama (23). Zbog značajne uštede u vremenu do dobijanja rezultata, optimizacija ovih tehnologija za detekciju patogena iz pune krvi je glavni fokus trenutnih istraživanja. Najveće ograničenje u razvoju i implementaciji direktnih testova iz krvi je mali broj mikroorganizama koji su prisutni u krvi pacijenata sa sepsom ($1-10^4$ CFU/ml).

Trenutno se najviše očekuje od tehnologije T2 magnetne rezonance (T2 Biosystems, SAD) (95). Dostupni su paneli za detekciju najčešćih i najznačajnijih bakterijskih i gljivičnih patogena kod infekcija krvi i paneli za detekciju gena antimikrobne rezistencije. Rezultat se dobija u roku od tri do pet sati (96). Pored navedenog sistema, u evaluaciji je Bosphore Sepsis Panel Bundle Kit (Anatolia geneworks, Turska) uz korišćenje ekstrakcionih kitova (UNIOA24S Extraction&PCR Setup System, Anatolia Geneworks i UNIO Whole Blood Genomic DNA Extraction Large Volume Kit, Anatolia Geneworks).

5. POSTANALITIČKA FAZA

5.1. Izveštaj o ispitivanju

Izveštaj treba da bude jasan, pregledan, čitljiv (ako je pisan rukom) i razumljiv. Potrebno je koristiti jasnu i standardizovanu terminologiju, a skraćenice treba izbegavati. Pre nego što se izvesti, izveštaj o ispitivanju se mora verifikovati (23,47).

Bez obzira da li je hemokultura pozitivna ili negativna, rezultat hemokulture je od izuzetnog značaja za pacijenta i njegovog kliničkog lekara.

5.1.1. Preliminarni izveštaj o ispitivanju

Primeri izveštaja su sledeći:

- testiranje u toku, nema rezultata do sada
- nema porasta posle 24 sata inkubacije
- nema porasta posle 48 sati inkubacije
- pozitivna hemokultura

Kada se detektuje pozitivna hemokultura, treba izvestiti usmeni i pisani preliminarni izveštaj (47).

Preliminarni izveštaj treba da sadrži:

- opis preparata iz hemokulture obojenog po Gramu (videti poglavlje 4.4.)
- rezultate preliminarnog testiranja, uključujući molekularne testove (videti poglavlje 4.6.)

5.1.2. Finalni izveštaj o ispitivanju

Negativan rezultat ispitivanja:

Zasejane podloge ostale su sterilne posle pet dana inkubiranja.*

* obavezno navesti broj dana inkubiranja.

Pozitivan rezultat ispitivanja sadrži:

- A. Broj pozitivnih hemokultura od ukupnog broja inokulisanih bočica za hemokulturu,
- B. Opis preparata iz hemokulture obojenog po Gramu (videti poglavlje 4.4.),
- C. Rezultat identifikacije,
- D. Rezultat testiranja antimikrobne osetljivosti.

Napomena: za kontaminante ne izvoditi niti izveštavati rezultat testiranja antimikrobne osetljivosti (Tabela 8). Komentar može da glasi: „Jedan set hemokultura od dva pozitivan. Izolovanje mikroorganizma ne znači infekciju. Nije urađen antibiogram. Kontaktirati laboratoriju za dodatne informacije.“

5.1.3. Tumačenje rezultata

Uzimanje uzorka krvi za hemokulturu podrazumeva uzimanje odgovarajućeg volumena krvi iz najmanje dve različite venepunkcije za najmanje dva seta hemokultura. Poređenje rezultata dobijenih u uzorcima iz svake venepunkcije omogućava nam pouzdanije tumačenje rezultata u slučaju kontaminacije ili infekcije (Tabela 8) (47,97).

A. Generalno, izveštaj o pozitivnoj hemokulturi se tumači kao prisustvo bakterijemije kod bolesnika. Međutim, mikrobiota kože može biti kontaminant/i u hemokulturi, što za posledicu ima lažno pozitivan rezultat ili pseudobakterijemiju. Razlozi za pseudobakterijemiju mogu biti:

1. Mikroorganizam se vidi na preparatu, a ne kultiviše se - moguće da nije vijabilan, ali se nalazi u medijumu.

2. *Bacillus* spp. i druge bakterije mogu biti prisutni na nesterilnim rukavicama osobe koja vadi krv.

3. Moguća je kontaminacija u laboratoriji.

B. Mešana hemokultura je moguća i nije retkost. Uzeti u obzir kod opisa preparata i izbora hranljivih podloga za subkultivisanje.

Tabela 8. Tumačenje rezultata hemokultura.

Rezultat		Tumačenje	Komentar
Set 1	Set 2		
Sterilan	Sterilan	- Nema infekcije - Uzročnika nije moguće kultivisati konvencionalnim metodama - Neadekvatan volumen	Ponoviti mikrobiološku analizu krvi istom i/ili drugom metodom
Izolovanje mikroorganizma iz grupe visokog rizika ^a	Sterilan	Verovatni uzročnik sepsa	Sprovođenje ciljane antimikrobne terapije ^b
Izolovanje mikroorganizma iz grupe visokog rizika ^a	Izolovanje istog mikroorganizma iz grupe visokog rizika ^a	Uzročnik sepsa	Sprovođenje ciljane antimikrobne terapije ^b
Izolovanje mikroorganizma iz grupe niskog rizika ^c	Sterilan	Moguća kontaminacija	Ponoviti mikrobiološku analizu krvi
Izolovanje mikroorganizma iz grupe niskog rizika ^c	Izolovanje istog mikroorganizma iz grupe niskog rizika ^c	Uzročnik sepsa	Sprovođenje ciljane antimikrobne terapije ^b
Izolovanje mešane kulture istih mikroorganizama u oba seta	Izolovanje mešane kulture istih mikroorganizama u oba seta	Mogući uzročnici sepsa ^d	Sprovođenje ciljane antimikrobne terapije ^b

^a U grupu spadaju: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, beta-hemolitički streptokok, *Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Enterobacteriales*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria meningitidis*, *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Pasteurella* spp., anaerobne bakterije, bakterije iz HACEK grupe, *Candida* spp. i drugi patogeni krvi.

^b Ako kliničko stanje pacijenta ukazuje na sepsu.

^c Grupi pripadaju mikroorganizmi koji često uzrokuju kontaminaciju uzoraka krvi: koagulaza-negativne stafilokoke (u 60-70% slučajeva je lažno pozitivan rezultat), *Micrococcus* spp., alfa-hemolitičke streptokoke, *Corynebacterium* spp., *Cutibacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacillus* spp.

^d U nekim slučajevima moguća je infekcija sa više mikroorganizama, npr. kod pacijenata sa imunodeficijencijom, nakon transplantacije, u slučaju infekcije trbušne šupljine, i drugo.

Brojni faktori utiču na dobijanje lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata hemokulture.

Neki od najvažnijih su:

- premali volumen krvi (nedovoljna proizvodnja CO₂) - nema signala rasta,
- nedovoljan broj uzoraka/setova bočica – smanjenje stope analitičkog prinosa,
- neodgovarajuće vreme uzimanja uzorka (prerano ili prekasno, naročito važno kod pacijenata koji su na antimikrobnoj terapiji) – nema porasta mikroorganizama, nema signala rasta,

- nepravilno uzimanje uzorka, neadekvatna dezinfekcija mesta venepunkcije, zatvarača bočice i ruku osoblja – kontaminacija uzorka,
- neodgovarajući uslovi transporta i čuvanja (preniska/previsoka temperatura) - uništavanje mikroorganizama, nema signala rasta,
- predugo vreme između uzimanja uzorka i početka inkubacije u automatizovanom sistemu (razmnožavanje mikroorganizama pre stavljanja bočice u komoru inkubatora, blagi porast CO₂ tokom očitavanja u uređaju) – nema signala rasta,
- neodgovarajuća bočica – nedostatak odgovarajućih uslova za rast, nema signala rasta,
- prisutnost faktora koji inhibiraju rast mikroorganizama u krvi (npr. visoka koncentracija antibiotika) – nedostatak odgovarajućih uslova za rast, nema signala rasta,
- prisutnost mikroorganizama u uzorku koji ne proizvode dovoljno CO₂ - nema signala rasta (23,47,98).

5.1.4. Ograničenja

A. Medijumi koji se koriste možda ne podržavaju rast svih patogena krvi. Zbog toga se preporučuje korišćenje različitih formulacija medijuma.

B. SPS može da inhibira rast i vijabilnost nekih mikroorganizama.

C. I druge bolesti mogu biti prisutne, sa obzirom na mnoge slučajeve nejasnih febrilnih stanja (23).

5.2. Čuvanje izolata

Pozitivne bočice za hemokulturu mogu se čuvati sedam do 14 dana na sobnoj temperaturi. Svi klinički značajni izolati (po jedan izolat od svakog seta hemokultura) treba presejati na odgovarajući medijum (npr. komercijalni medijumi microbank ili cryobank) i upisati u evidenciju. Vreme čuvanja izolata može varirati zavisno od akademskih/naučnih interesa laboratorije, a u interesu pacijenta je da se čuvaju najmanje dve godine (23,47).

6. IZOLOVANJE RETKIH I PROBIRLJIVIH BAKTERIJA

Retke i probirljive bakterije se ne izoluju često iz krvi, ali mogu biti uzročnici teških infekcija. U većini slučajeva automatizovani sistemi za hemokulture omogućavaju njihovu uspešnu detekciju primenom standardnog laboratorijskog protokola od pet dana inkubiranja (99). Ukoliko sistem signalizira pozitivnu hemokulturu pred kraj protokola (inkubacionog perioda), često se radi o porastu probirljivih bakterija. Na preparatima obojenim po Gramu se nekada teško uočavaju zbog malih dimenzija, neuobičajenog oblika ili odsustva ćelijskog zida. U nekim slučajevima primena dodatnih bojenja, kao što je akridin oranž, može biti od pomoći (100). Identifikacija retkih i probirljivih bakterija olakšana je primenom savremenih metoda kao što je MALDI-TOF MS. Neke bakterije, kao što su rodovi *Bartonella*, *Coxiella*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Tropheryma whippiei* i *Mycoplasma*, ne mogu se kultivisati na standardnim bakteriološkim podlogama, te je za njihovu detekciju potrebno primeniti molekularne metode (23).

6.1. HACEK grupa

HACEK grupa obuhvata *Haemophilus* spp. (osim *Haemophilus influenzae*), *Aggregatibacter* spp., *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens* i *Kingella* spp. Iako pripadaju mikrobioti gornjih respiratornih puteva, mogu izazvati teške infekcije (endokarditis, bakterijemiju, osteomijelitis). Inkubacija hemokultura od pet dana je dovoljna za izolovanje HACEK grupe iz krvi. Za subkultivisanje koriste se obogaćene podloge kao što je čokoladni agar, koje je potrebno inkubirati najmanje 48 h u atmosferi sa 5-10% CO₂ (23).

6.2. *Bartonella* spp.

Iako bakterije roda *Bartonella* mogu da rastu u bočicama za hemokulturu, retko se izoluju na ovaj način. Za njihovo izolovanje iz krvi preporučuje se metoda liziranja uzorka krvi praćena centrifugiranjem, a potom zasejavanjem sedimenta na obogaćene podloge kao što je čokoladni agar. Podloge se inkubiraju 14-21 dan na temperaturi od 35°C, u vlažnoj sredini i atmosferi sa povećanom koncentracijom CO₂ (101). Alternativno, može se koristiti sistem sa litičkim bujonom koji se inkubira sedam dana, a onda presejava na odgovarajuće čvrste podloge (102).

6.3. *Brucella* spp. i *Francisella* spp.

Savremeni automatizovani sistemi omogućavaju detekciju bakterija roda *Brucella* u krvi u 95% slučajeva tokom protokola inkubacije od sedam dana, uglavnom iz aerobnih bočica (103). Obrada pozitivne hemokulture kod sumnje na brucelozu radi se u komori za bezbedan rad nivoa 3 (engl. biosafety cabinet level 3). Na preparatu obojenom po Gramu uočavaju se sitni, bleđi Gram-negativni kokobacili. Subkultura na odgovarajućoj čvrstoj hranljivoj podlozi za *Brucella* spp. se inkubira u uslovima povećane vlažnosti i atmosferi sa 5-10% CO₂ (23).

Za izolovanje *Francisella tularensis* u automatizovanim sistemima za hemokulture inkubaciju je potrebno produžiti na 10 dana, uz obavezno subkultivisanje na kraju perioda inkubacije (101). Na preparatima obojenim po Gramu ova bakterija se teško uočava jer je pleomorfna i malih dimenzija. Subkultivisanje se vrši na podlogu obogaćenu cisteinom (npr. BCYE agar), triptikaza soja agar sa 5% ovčije krvi, čokoladni agar i MacConkey agar. Podloge se inkubiraju tri do sedam dana na 35°C u vlažnim uslovima i u atmosferi sa 5-10% CO₂ (23).

6.4. *Campylobacter* spp. i *Helicobacter* spp.

Najčešće vrste roda *Campylobacter* koje uzrokuju sistemske infekcije, *C. jejuni*, *C. coli* i *C. fetus*, uspešno se detektuju u automatizovanim sistemima za hemokulturu (104,105). Na preparatu obojenom po Gramu ovi sitni, bleđi, zakrivljeni Gram-negativni bacili su nekada teško uočljivi, pa se može primeniti akridin oranž bojenje radi bolje vizualizacije. Subkulturu na odgovarajućoj selektivnoj podlozi potrebno je inkubirati 72 h u mikroaerofilnim uslovima (5% O₂, 85% N₂, 10% CO₂) na temperaturama 35-37°C i 42°C.

Ukoliko postoji sumnja na infekciju enterohepatičnim vrstama helikobakterija (*H. cinaedi*, *H. canis*, *H. fennelliae*), inkubaciju hemokultura treba produžiti na sedam dana (105). U slučaju pozitivnog signala, kao i na kraju perioda inkubacije, hemokulturu subkultivisati i inkubirati u atmosferi sa povećanom koncentracijom H₂ (106).

6.5. *Legionella* spp.

Legionella spp. može izazvati sekundarne bakterijemije udružene sa pneumonijom, a u retkim slučajevima endokarditis. Iako može da raste u bočicama za hemokulturu, retko daje pozitivan signal u aparatu (107). Stoga je potrebno subkultivisanje po isteku inkubacije od pet dana. Subkultiviše se na podloge sa cisteinom (npr. BCYE agar). *Legionella* spp. se teško uočava na preparatu obojenom po Gramu, te se preporučuje korišćenje 0,1% baznog fuksina umesto šafranina radi bolje vizualizacije (23).

6.6. *Leptospira* spp.

Bakterije roda *Leptospira* se izuzetno retko izoluju iz hemokultura, pa se za dijagnostiku infekcija izazvanih ovim bakterijama preporučuju druge metode (108).

6.7. *Abiotrophia* spp. i *Granulicatella* spp.

Bakterije rodova *Abiotrophia* i *Granulicatella* su uzročnici endokarditisa, klinički značajnih bakterijemija i drugih teških infekcija. Porast u hemokulturi se može detektovati tokom standardne inkubacije od pet dana u automatizovanim sistemima. Kada se sumnja na infekciju uzrokovanu ovim probirljivim bakterijama, potrebno ih je subkultivisati na obogaćene hranljive podloge, kao što je čokoladni agar ili podloga za anaerobne bakterije. Alternativno, može se koristiti krvni agar sa *Staphylococcus aureus* crtom, jer ove bakterije rastu oko kolonija *S. aureus* (fenomen satelitizma) (101).

6.8. *Mycoplasma* spp.

Iako su opisani slučajevi izolovanja mikoplazmi iz konvencionalnih sistema za hemokulturu, za njihovo izolovanje iz krvi potrebno je primeniti specifične, obogaćene podloge (npr. sa argininom) (109).

7. POSEBNA RAZMATRANJA

7.1. Infekcije krvi povezane sa intravaskularnim kateterom

Za utvrđivanje infekcije krvi povezane sa intravaskularnim kateterom uglavnom se koriste sledeća tri pristupa (23,47,97):

a) Kultura vrha intravaskularnog katetera

Potrebno je istovremeno uzeti vrh katetera (3-5 cm) i krv za hemokulturu iz periferne vene.

Kod semikvantitativne metode po Makiju (metoda rolanja katetera po hranljivoj podlozi) značajnim se smatra nalaz ≥ 15 CFU nakon 48 h inkubacije na 35°C u aerobnim uslovima. Ako je u hemokulturama porastao isti mikroorganizam kao na kulturi katetera najverovatnije se radi o infekciji krvi. Nedostatak ove metode je otkrivanje mikroorganizama koji su prisutni samo na spoljašnjoj površini katetera.

Kod kvantitativne kulture vrha katetera pozitivnim se smatra nalaz $\geq 10^3$ CFU/mL. Ako je u hemokulturama porastao isti mikroorganizam kao na kulturi katetera radi se o infekciji krvi.

b) Diferencijalno vreme pozitivnosti hemokultura

Potrebno je istovremeno uzeti krv za hemokulturu iz periferne vene i iz intravaskularnog katetera. Ukoliko je u hemokulturama uzetim sa oba mesta porastao isti mikroorganizam, a uz to je vremenska razlika u pozitivnosti hemokultura uzetih iz katetera i periferne krvi više od dva sata, najverovatnije se radi o infekciji krvi povezanoj sa intravaskularnim kateterom.

c) Kvantitativne hemokulture

Potrebno je istovremeno uzeti krv za hemokulturu iz periferne vene i iz intravaskularnog katetera. Metoda se zasniva na broju kolonija izolovanih iz krvi uzete iz intravaskularnog katetera koja treba da bude najmanje tri puta veći od broja kolonija u krvi dobijenoj iz periferne vene. Za kvantitativno određivanje broja poraslih mikroorganizama iz hemokultura moraju se koristiti posebni sistemi za kvantitativnu ili semikvantitativnu kultivaciju mikroorganizama u krvi.

7.2. Infektivni endokarditis

Kod sumnje na infektivni endokarditis, najvažnije je bez odlaganja uzeti uzorke krvi za hemokulturu. Vreme uzorkovanja je manje značajno jer je bakterijemija uglavnom kontinuirana. Iako je poželjno uzorke uzeti pre započinjanja empirijske antimikrobne terapije, pacijenti kod kojih se sumnja na infektivni endokarditis veoma često već dobijaju antimikrobne lekove. Zato je od ključne važnosti korišćenje podloga sa faktorima za neutralizaciju antibiotika (111).

Preporučuje se uzimanje tri seta hemokultura, sa tri različita mesta venepunkcije (izbegavati uzorkovanje kroz intravaskularni kateter). Set treba da sadrži aerobnu i anaerobnu bočicu. Na ovaj način se povećava volumen krvi i verovatnoća izolovanja uzročnika, ali i olakšava prepoznavanje kontaminacije (lažno pozitivna hemokultura) (23). Ukoliko nema pozitivnih bočica u prva 24 h, uzorkovati još dva seta hemokultura (47,97).

Inkubacija hemokultura u savremenim automatizovanim sistemima omogućava detekciju najvećeg broja uzročnika endokarditisa tokom protokola od pet dana, uključujući i većinu probirljivih bakterija (23,112). Određeni izuzeci su opisani u poglavlju 6. U slučaju negativnog rezultata na kraju perioda inkubacije najčešće se preporučuje subkultivisanje bočica, ali ne postoji jasan konsenzus struke (98).

Zbog brojnih faktora rizika povezanih sa savremenim medicinskim procedurama, incidencija gljivičnih endokarditisa je u porastu (113). Najvažniji faktori rizika su dugotrajna upotreba antibiotika, dugotrajna intravaskularna kateterizacija, hiperalimentacija, imunosupresija, upotreba prostetičkih uređaja (113).

7.3. Gljivične infekcije krvi

Prisustvo gljiva u krvi (fungemija) je češće u populaciji kod koje su prisutni određeni faktori rizika. Za fungemiju izazvanu kvasnicama glavni faktori rizika su: ulceracije gastrointestinalne mukoze, teška imunosupresija (AIDS, hematološki maligniteti, transplantacije organa, imunomodulatorna terapija autoimunih bolesti), primena antibiotika širokog spektra, hiperalimentacija, primena intravaskularnih katetera. Najčešće vrste kvasnica koje se izoluju iz krvi su *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* i *Cryptococcus neoformans*. Najveći značaj ima izolovanje *C. auris*, zbog rezistencije na antigljivične lekove i rizika od transmisije, uključujući i izazivanje bolničkih epidemija (113). Najčešće vrste plesni koje izazivaju fungemije pripadaju rodovima *Fusarium* i *Scedosporium*, ređe *Exophiala*, *Aspergillus* i drugim. Izolovanje bifaznih gljiva (*Histoplasma* spp., *Blastomyces* spp., *Coccidioides* spp.) iz krvi značajno je za endemska područja (23).

Pri sumnji na fungemiju preporučuje se uzeti dva do tri seta hemokultura (set sadrži dve do tri bočice u zavisnosti od proizvođača, videti poglavlje 4.1.1.). Krv za hemokulturu treba nastavljati uzimati svakodnevno dok traje sumnja na fungemiju. Najčešće se porast detektuje za dva do pet dana u aerobnim bočicama i bočicama za gljive (114). Nakon subkultivisanja, ukoliko postoji sumnja na fungemiju izazvanu plesnima, podloge je potrebno inkubirati bar četiri nedelje. Za identifikaciju izolovanih gljiva najbolje je primeniti savremene metode (MALDI-TOF MS, molekularne metode). Testiranje antimikrobne osetljivosti treba izvoditi u skladu sa važećim standardima i preporukama (EUCAST, CLSI) (23).

7.4. Hemokulture u cilju praćenja i nadzora

U trenutno dostupnoj literaturi nedostaju jaki dokazi za ponovno uzimanje krvi za hemokulturu kod pacijenata sa prethodno pozitivnom hemokulturom. Pokazano je da u najvećem broju slučajeva (83,4%) ponovljene hemokulture su negativne, a novi patogen izolovan je u svega 2,5% ponovljenih hemokultura (98).

Uzimanje krvi za hemokulturu u cilju praćenja terapijskog odgovora indikovano je kod: a) teško obolelih i/ili teško imunokompromitovanih pacijenata, b) suspektne endovaskularne infekcije, c) bakterijemije sa *Staphylococcus aureus*, d) kandidemije, e) bakterijemije sa multirezistentnom Gram-negativnom bakterijom. Preporuka je da se ponavljanje izvodi 48-72 h nakon dobijanja pozitivne hemokulture (98). U navedenim slučajevima prisustvo ili odsustvo kontinuirane bakterijemije/fungemije usmerava dalji tok lečenja.

8. KONTROLA KVALITETA ANALIZE HEMOKULTURA

Redovno izvođenje kontrole kvaliteta rada u mikrobiološkim laboratorijama je neophodno. Ono omogućava da eventualne greške budu uočene i da se shodno tome preduzmu korektivne mere radi otklanjanja uzroka kao i preventivne mere koje treba da spreče i/ili smanje rizik nastajanja grešaka u budućnosti. Mnoge mikrobiološke laboratorije su u cilju poboljšanja kvaliteta svog rada započele proces uvođenja sistema upravljanja kvalitetom. Sistem upravljanja kvalitetom omogućava obezbeđenje kvaliteta i kompetentnosti u svim aspektima rada jedne medicinske mikrobiološke laboratorije sa krajnjim ciljem unapređenja radnog procesa i povećanja zadovoljstva korisnika usluga. Kvalitet možemo definisati kao usklađenost sa unapred zadatim zahtevima, a kada su u pitanju medicinske laboratorije, zahtevi su najčešće definisani međunarodnim ISO standardima, konkretno ISO 15189 (Medicinske laboratorije - Zahtevi za kvalitet i kompetentnost) (115). Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je pripremila vodič za uvođenje sistema upravljanja kvalitetom laboratorija, Laboratory quality management system - LQMS, koji je zasnovan na ISO 15189 standardu i javno je dostupan na sajtu SZO (116).

Sistem upravljanja kvalitetom treba da obuhvati sve tri faze (preanalitičku, analitičku i postanalitičku), odnosno sve procese i postupke u radu jedne laboratorije. Sistem upravljanja kvalitetom opisuje u okviru 12 osnovnih elemenata kvaliteta koji predstavljaju „gradivne blokove“ ovog sistema i to su okruženje i bezbednost, organizacija, osoblje, oprema, nabavke i inventar, upravljanje procesima, upravljanje informacijama, dokumenti i zapisi, usluživanje klijenata/korisnika usluga, ocenjivanje/procena, upravljanje neželjenim događajima i unapređenje procesa (116). Kontrola kvaliteta izvođenja hemokulture će biti u ovom poglavlju predstavljena prema navedenim elementima sistema upravljanja kvalitetom.

8.1. Upravljanje procesima

8.1.1. Uzimanje i transport uzoraka za hemokulturu

Krv za hemokulturu se uzima najčešće venepunkcijom, a zatim stavlja u bočice za hemokulturu i što pre transportuje do laboratorije. Kako se mikrobiološke laboratorije često nalaze udaljene od ustanove/a gde se uzorci uzimaju, laboratorija treba da se pobrine da se uzimanje i transport uzoraka za hemokulturu odvija adekvatno, odnosno u skladu sa preporukama proizvođača bočica za hemokulturu i sa principima dobre laboratorijske prakse (23). Najvažniji izazovi sa kojima se laboratorija susreće kada se uzorkovanje vrši na više udaljenih mesta i uzorci transportuju u centralizovanu laboratoriju su:

1. Pravilno uzorkovanje krvi za hemokulturu,
2. Očuvanje vijabilnosti bakterija u uzorku (bočici za hemokulturu),
3. Transport u odgovarajućim uslovima i u što kraćem vremenskom periodu,
4. Hitno izveštavanje rezultata analize ordinirajućem lekaru.

U literaturi ne postoji konsenzus oko preporuka kako se izvodi hemokultura u slučaju kada je mikrobiološka laboratorija fizički udaljena od mesta uzorkovanja (23). Zato prilikom pripreme uputstva za uzimanje i transport uzoraka za hemokulturu od strane osoblja laboratorije, treba razmotriti udaljenost mesta uzorkovanja od laboratorije, brzinu i učestalost transporta uzoraka i diskrepancu u radnim vremenima laboratorije i mesta uzorkovanja (kliničko-bolnički centar ili dr.). Postupak treba da obezbedi da vreme od uzimanja uzorka do obrade u laboratoriji bude najkraće moguće (117). Ukoliko je izvodljivo, automatizovani sistem za brzu detekciju porasta bakterija u hemokulturi može da bude postavljen na mestu uzorkovanja, a da se pozitivne hemokulture presejavaju na podloge i transportuju u centralizovanu laboratoriju. U tom slučaju na mestu uzorkovanja bi trebalo obezbediti minimalno osoblje obučeno da iz pozitivne hemokulture napravi i pregleda preparat obojen po Gramu i da preseje i inkubira podloge (23). Pored navedenog, kod satelitskih sistema, pozitivne hemokulture, kao i hemokulture u protokolu se transportuju do glavne (centralne) laboratorije (videti poglavlje 4.1.).

Ukoliko se bočice transportuju u centralizovanu laboratoriju, inokulisane bočice za hemokulturu treba da se drže na sobnoj temperaturi od uzimanja uzorka, do ubacivanja bočica u aparat za hemokulture u laboratoriji. U transportu treba sprečiti temperaturne fluktuacije što se postiže korišćenjem obloženih torbi/nosivih frižidera. Poželjno je da se temperatura izmeri u više vremenskih tački tokom transporta, radi preciznijeg uvida u uslove transporta i notiranja minimalne i maksimalne zabeležene temperature (23).

Izvođenje hemokulture je neophodno i kritično za postavljanje dijagnoze sistemskih infekcija (117), pa kontrola kvaliteta treba da obuhvati postupak uzimanja materijala koji je opisan u poglavlju 3. Pošto na rezultat analize ključno utiče količina uzete krvi (118), treba posebnu pažnju obratiti na zapreminu tečnosti u bočicama sa inokulisanim uzorcima (23,119). Prevencija kontaminacije mikroorganizmima sa kože je takođe izuzetno značajna. Porast kontaminanata je nekada teško proceniti, jer septične epizode mogu izazvati različiti mikroorganizmi, pa je priprema mesta uzorkovanja važna, kao i kontinuirano praćenje učestalosti kontaminacije, o čemu će više reči biti u daljem tekstu. Stopa kontaminacije hemokultura treba da bude niža od 3% (23,117,120).

Pisana uputstva za uzimanje krvi za hemokulturu i uputstva za adekvatan transport uzoraka treba da budu distribuirana svim korisnicima usluga laboratorije i dostupna na svim mestima uzorkovanja.

8.1.2. Procena potrebnih kapaciteta

Kapacitet laboratorije da obradi hemokulture treba da odgovara potrebama kliničko-bolničkih centara koji uzorke upućuju na analizu u datu laboratoriju. Procena koliko aparata za hemokulture je laboratoriji potrebno, treba da bude izvršena na osnovu broja izvedenih analiza hemokultura u ranijem periodu. Pored navedenog, treba uzeti u obzir i broj stanovnika regije, kapacitet bolnica (broj kreveta) koje šalju uzorke i sezonske varijacije u učestalosti sistemskih oboljenja (sepsa, pneumonija sa bakterijemijom i dr.). Laboratorija treba da pažljivo prouči podatke o pozitivnim hemokulturama i da proceni koliko je srednje vreme potrebno da hemokultura postane pozitivna. Na osnovu tih podataka, u slučaju ako dođe do nepredviđene popunjenosti kapaciteta, laboratorija može da smanji vreme inkubacije bočica, kako bi se prilagodila povećanoj potrebi za analizom (23).

8.1.3. Nabavke i inventar

Laboratorija treba da uspostavi sistem upravljanja zalihama koji obuhvata plan nabavki bočica za hemokulturu (115,116). Na ovaj način se obezbeđuje kontinuitet obavljanja usluge i sprečava da dođe do nestanka reagenasa (bočica za hemokulturu) u slučaju da dobavljač kasni sa isporukom, ili da je došlo do kašnjenja u proizvodnji i/ili uvozu. Dakle, laboratorija treba da razvije plan za slučaj nestašice reagenasa na tržištu, prema kome bi obezbedila neometano pružanje usluga korisnicima. Laboratorija treba da unapred predvidi saradnju sa drugom laboratorijom koja bi mogla da preuzme i obezbedi eksterno pružanje usluga u kriznoj situaciji (115). Na taj način bi održavanje kontinuiteta rada bilo unapred isplanirano i laboratorija bi bila pripremljena za vanredne situacije, a svi esencijalni procesi bi funkcionisali.

Ako ipak dođe do neželjenog prekida tj. nemogućnosti pružanja usluge, neophodno je hitno obavestiti sve korisnike usluga.

8.1.4. Validacija i verifikacija

Većina mikrobioloških laboratorija koristi automatizovane sisteme za brzu detekciju porasta bakterija u hemokulturi koje imaju CE i IVDR oznaku (engl. *in vitro* diagnostic device regulation). Validacija za navedene aparate se ne sprovodi u laboratoriji, jer proizvođač i regulatorna tela EU garantuju specificirane performanse proizvoda. Međutim, svaka laboratorija mora da izvrši verifikaciju odnosno postupak kojim se utvrđuje da je performansa aparata/dijagnostikuma u uslovima u laboratoriji u skladu sa predviđenim specifikacijama proizvođača. Verifikaciju je neophodno sprovesti prilikom uvođenja nove

metode rada u laboratoriju, kao na primer, pri instaliranju novog aparata za hemokulture, ili uvođenja novog tipa bočica za hemokulturu u upotrebu. U takvim slučajevima, može se uporedo pustiti u rad postojeći aparat za hemokulture i novi aparat, ili koristiti istovremeno ranije korišćene bočice i nove bočice za hemokulturu inokulisane istom količinom određenog mikroorganizma, čime bi stekli uvid da li metode funkcionišu u laboratoriji u skladu sa karakteristikama koje je proizvođač naveo (23). Pored navedenog, interne provere aparata (temperatura inkubiranja bočica i dr.) i podloga za hemokulturu treba periodično izvoditi sledeći uputstvo proizvođača. Učešće u eksternoj proceni je poželjno kao npr. učešće u programima eksterne provere kvaliteta (EQA, external quality assessment), ili međulaboratorijskim poređenjima.

8.2. Dokumenti i zapisi

Zapisi o analizi hemokulture treba da se čuvaju na prethodno definisanom medijumu (elektronski, papirni ili dr.) u skladu sa procedurom za upravljanje zapisima koje laboratorija treba da uspostavi u okviru sistema upravljanja kvalitetom. Dužina čuvanja treba da bude u skladu sa lokalnom zakonskom regulativom i zahtevima standarda (115,116).

8.3. Upravljanje neželjenim događajima

Većina laboratorija koristi kompjuterske informacione sisteme koji zbog održavanja ili drugih razloga, privremeno moraju biti van funkcije. Laboratorija treba da predvidi takve situacije i da uspostavi sistem koji omogućava da bočice za hemokulturu budu zavedene i stavljene bez odlaganja u aparat za hemokulturu u slučaju kada laboratorijski informacioni sistem ne funkcioniše. Isto važi i za izdavanje rezultata analize hemokulture koja treba da bude promptna i da se neometano odvija u slučaju da laboratorijski informacioni sistem ne radi (23).

Ako dođe do nepredviđenog nestanka struje i do prekida u radu aparata za hemokulture duže nego što predviđa proizvođač aparata, laboratorija treba da ima uspostavljenu proceduru za konvencionalnu obradu hemokultura koja stupa na snagu u kriznim situacijama (23,115).

8.4. Ocenjivanje i provera

8.4.1. Unutrašnja kontrola kvaliteta

Laboratorija treba da vrši unutrašnju procenu svih faza svog rada uključujući preanalitičku, analitičku i postanalitičku fazu. Pored redovnog kontrolisanja procesa rada, laboratorija treba da odabere i proverava indikatore kvaliteta. Indikator kvaliteta je mera stepena do kog karakteristike metoda ispunjavaju predviđene zahteve. Indikatori kvaliteta omogućavaju laboratoriji da proceni svoje performanse. Uspostavljanje indikatora kvaliteta je i zahtev sistema upravljanja kvalitetom (115), a indikatori moraju biti planirani, imati definisan cilj, metodologiju, način tumačenja, plan mera i dužinu praćenja (23). Odabrani indikator kvaliteta za analizu hemokultura treba redovno pratiti radi procene uspeha implementiranih mera (Tabela 9) (23).

8.5. Procena učestalosti kontaminiranih hemokultura

Kontaminacija hemokulture se najčešće definiše kao izolacija mikroorganizma kontaminanta u jednoj ili obe bočice jednog seta za hemokulturu tokom 24 h. Mikroorganizmi koji se uobičajeno smatraju kontaminantima su bakterije koje su deo normalne mikrobiote kože i malog su patogenog potencijala. To su koagulaza-negativne stafiločke, *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Cutibacterium* spp., *Aerococcus* spp., *Micrococcus* spp. i viridans grupa streptokoka (23,119,120). Do kontaminacije dolazi u slučaju da je krv za hemokulturu neadekvatno uzeta (npr. kroz kateter) ili zbog neadekvatne pripreme mesta venepunkcije (korišćenje antiseptika koji nisu preporučeni, kratko vreme izlaganja antisepticima i drugo). Imajući u vidu da mikroorganizmi sa kože mogu biti uzročnici sepse, nekada je teško proceniti da li je nalaz ovih bakterija značajan ili se radi o kontaminaciji. Ako nisu uzeti dodatni setovi krvi za hemokulturu, zaključak je često nemoguće izvesti.

Tabela 9. Primeri indikatora kvaliteta za analizu hemokultura.

Aktivnost	Indikator kvaliteta
Preanalitička faza	
Procena pacijenata	% pacijenata sa sumnjom na sistemsku infekciju krvi kojima je krv za hemokulturu uzeta u sklopu inicijalne dijagnostike i zbrinjavanja pacijenta
Odabir analize i zahtev za analizom	% pacijenata kod kojih je adekvatan broj uzoraka krvi uzet za analizu - Preporučeno je uzimanje 2-3 seta uzoraka krvi za hemokulturu tokom 24h po epizodi sistemske infekcije krvi % pacijenata kod kojih je uzet veći broj uzoraka krvi za hemokulturu nego što je preporučeno - Uzimanje dodatnih setova krvi za hemokulturu je preporučeno posle 48 - 72h ako inicijalno uzeti setovi krvi za hemokulturu nisu informativni; izuzev navedenog, uzimanje više uzoraka nije opravdano
Uzimanje uzoraka	% kontaminiranih hemokultura (mogu se preračunati učestalosti po odeljenjima ili po osoblju koje vrši uzimanje uzoraka) - Prihvatljiv % kontaminacije je <3%; u institucijama gde se sprovode najadekvatnije procedure uzimanja krvi, % kontaminacije je 1% % bočica za hemokulturu u kojima je volumen krvi veći ili manji od predviđenog, ako je moguće, mogu se preračunati učestalosti po odeljenjima ili po osoblju koje vrši uzimanje uzoraka % setova za hemokulturu gde je uzeta samo jedna bočica za hemokulturu % uzoraka krvi za hemokulturu uzetih neadekvatno, kroz uređaj za stalni vaskularni pristup % odbijenih uzoraka krvi za hemokulturu zbog grešaka pri uzimanju uzorka (neobeležena bočica, odsustvo ID pacijenta na bočici)
Transport uzorka	% poslatih uzoraka za hemokulturu koji nisu transportovani u skladu sa preporukama proizvođača
Prijem uzoraka i obrada	% odbijenih analiza hemokulture, za koje je naručilac analize obavešten (komunikacija je dokumentovana) % bočica za hemokulturu koje su po prijemu u laboratoriji stajale >30 min, pre nego što su stavljene u aparat za hemokulturu Učestalost uzimanja samo jednog seta bočica za hemokulturu od pacijenta tokom 24h -za hospitalizovane pacijente sa sumnjom na sistemsku infekciju krvi preporučeno je uzimanje najmanje 2 seta bočica za hemokulturu tokom 24h
Analitička faza	
Detekcija mikroorganizama, ID, AST, verifikacija pouzdanosti rezultata i interpretacija	% inkubiranih bočica u aparatu za hemokulturu koje su pozitivne % inkubiranih bočica za koje je aparat dao lažno pozitivan signal % bočica gde se preliminarni rezultat razlikovao od finalnog (preparat bojen po Gramu, molekularna metoda, druga brza metoda)(121) % bočica za koje je neophodna korekcija rezultata
Postanalitička faza	
Izveštavanje kritičnih rezultata i preliminarno izveštavanje	% bočica za hemokulturu kod kojih je preparat obojen po Gramu napravljen posle > 1h od pozitivnog signala i/ili su preliminarni rezultati javljeni posle >2h % kritičnih rezultata o kojima je naručilac analize obavešten za < 1 h (komunikacija je dokumentovana) -Kritične rezultati koji su potvrđeni u laboratoriji, treba u roku od 1 h izvestiti ordinirajućem lekaru, a komunikacija treba da bude detaljno dokumentovana

Radi unapređenja kvaliteta izvođenja hemokulture, laboratorija treba da ima uvid u učestalost kontaminacije. Unapređenje izvođenja analize hemokulture i smanjenje stope kontaminacije se postiže:

1. davanjem jasnih pisanih uputstava svim korisnicima usluge,

2. određivanjem učestalosti kontaminacije pažljivom procenom svih urađenih hemokultura,
3. stalnom periodičnom analizom učestalosti kontaminacije, prihvatljivih limita ($< 3\%$) i uspešnosti korektivnih mera preduzetih da se stopa kontaminacije smanji u slučaju da je visoka.

Preračunavanje učestalosti kontaminacije se vrši deljenjem broja kontaminiranih hemokultura sa ukupnim brojem urađenih hemokultura tokom definisanog vremenskog perioda i množenjem sa 100. Greške u preračunatoj učestalosti ovom metodom su neminovne: neki slučajevi sistemskih infekcija se lažno proglašavaju kontaminacijom i obrnuto, infekcijom se npr. proglašava izolacija kontaminanata u jednom setu bočica uzetom tokom 24 h, u slučaju kada nije uzeto više uzoraka. Da bi sagledavanje učestalosti kontaminacije bilo što pouzdanije, poželjno bi bilo da ovlašćeno osoblje laboratorije ima pristup kliničkim podacima o pacijentu. Tada bi analiza pojedinačnih slučajeva omogućila realniji uvid. Na primer, ako pacijent nije imao znake infekcije, a izolovan je kontaminant u hemokulturi, nalaz bi mogao biti proglašen kontaminacijom, ili izolacija koagulaza-negativnog stafilokoka iz jednog seta bočica za hemokulturu od pacijenta koji nije imao faktore rizika za nastanak sistemske infekcije (npr. odsustvo plasiranog centralnog venskog katetera ili drugog vaskularnog pristupa). Nejasne slučajeve u kojima ovakvu procenu nije moguće napraviti, trebalo bi isključiti iz analize. Rezultati dobijeni ovakvom analizom bi bili znatno pouzdaniji.

Laboratorija bi trebalo da uspostavi proceduru obrade potencijalno kontaminiranih uzoraka krvi za hemokulturu. U slučaju izolacije kontaminanta u samo jednoj bočici seta, antibiogram ne bi trebalo raditi (videti poglavlje 5.1.2.) ili, ako je urađen, nije neophodno da se izvesti (122).

Kontaminaciju nije moguće potpuno sprečiti i kada se sprovode najbolje procedure uzorkovanja, stope iznose oko 1% (23,120). U slučaju da je stopa kontaminacije $>3\%$, treba hitno sprovesti detaljniju analizu učestalosti kontaminacije po odeljenjima i osoblju koje vrši venepunkciju. Po potrebi treba organizovati dodatne obuke za osoblje, uvesti zatvorene integrisane sisteme za uzorkovanje koji smanjuju rizik od kontaminacije, i ako je neophodno, isključiti radnike kod kojih su stope kontaminiranih hemokultura konstantno visoke (123).

8.6. Izveštaj o rezultatima

Izveštaj o rezultatu hemokulture je hitan rezultat koji zahteva promptno obaveštavanje ordinirajućeg lekara i dokumentovanje da je komunikacija obavljena (115,116). Ako je neophodno napraviti korekciju u izveštaju o rezultatima koja utiče na lečenje pacijenta, takve slučajeve šef laboratorije treba svakodnevno da pregleda i razmatra razloge neusaglašenosti. Svi korigovani izveštaji o rezultatima treba periodično da se analiziraju kao deo redovnih internih provera i kontrole kvaliteta, a dobijeni rezultati treba da budu saopšteni ordinirajućim lekarima (korisnicima usluga) u cilju sagledavanja mogućnosti za poboljšanje.

8.7. Posebna razmatranja

8.7.1. Praćenje uzorkovanog volumena krvi

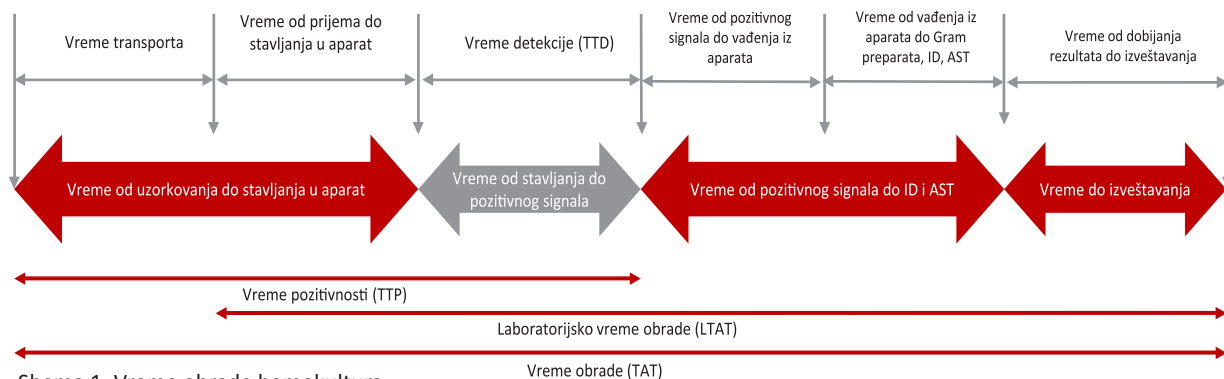
Poželjno je da laboratorija implementira specifičan sistem kvaliteta koji će za cilj imati praćenje statistike i trenda uzorkovanog volumena krvi (videti poglavlje 3.2.1.) po odeljenjima, i ako je moguće čak i po osobi koja je uzorkovala. Na tržištu već postoje moderna softverska rešenja koja su integrisana u aparate za hemokulture i laboratorijski informacioni sistem, čineći zajednički sistem koji objedinjuje dijagnostiku, statistiku i epidemiološki aspekt ove pretrage i prožima sve tri dijagnostičke faze detaljno obrađene u ovom vodiču.

Ovakva statistička obrada podataka omogućava dublje uvide u stanje kvaliteta, zatim omogućava da se organizuju ciljne dodatne edukacije kako bi se "povratnom petljom" osiguralo kontinuirano poboljšanje. Isti podaci se mogu revidirati svaka tri meseca (ili barem svakih šest meseci), te se rezultati trenutnog stanja i relevantni zaključci mogu poslati svim bolničkim odeljenjima tako da odgovorne osobe za kvalitet na svakom odeljenju i instituciji mogu objektivno pratiti napredak i dodatno intervenisati specifičnim treninzima ako je potrebno.

Ovakav način praćenja volumena kao glavnog parametra kvaliteta u mikrobiološkoj laboratoriji i saradničkim bolnicama/bolničkim odeljenjima predstavlja “zlatni dijagnostički standard kvaliteta” koji dugoročno osigurava najbolje ishode lečenja za pacijente, te ostvaruje punu interdisciplinarnu sinergiju kliničke mikrobiologije i saradničkih grana medicine.

8.7.2. Vremenske norme

Standardno vreme obrade (engl. turnaround time, TAT) u svi fazama mikrobiološke dijagnostike infekcija krvi je definisano i preporuka je da ne bi smelo da se prekorači (Shema 1) (videti poglavlje 3.) (23,124).



Shema 1. Vreme obrade hemokultura.

Na temelju ovih vremena, definiše se target i svaki radni dan se zapisuju vremena ili laboratorijski informacioni sistem (LIS) meri vreme za sve. Na taj način kada se napravi mesečni ili kvartalni izveštaj, može se videti u kojem se delu puta uzorka i mikrobiološke analize skriva neefikasnost i nepotrebno gubi dragoceno vreme, i u skladu sa tim dalje se sprovode korektivne mere (124).

8.7.3. Praćenje LOT brojeva i roka trajanja bočica za hemokulturu

Poželjno je da laboratorija vodi evidenciju LOT brojeva i roka trajanja bočica za hemokulturu po pacijentu, tako da može garantovati da nije korišćena bočica za hemokulturu sa isteklim rokom trajanja u dijagnostici (124).

9. LITERATURA

1. Hernandez Botero JS, Florian Perez MC. The History of Sepsis from Ancient Egypt to the XIX Century [Internet]. Sepsis - An Ongoing and Significant Challenge. InTech; 2012.
2. Agnello L, Giglio RV, Bivona G, Scazzone C, Gambino CM, Iacona A et al. The Value of a Complete Blood Count (CBC) for Sepsis Diagnosis and Prognosis. *Diagnostics* 2021, 11, 1881.
3. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992, 101, 1644–1655, doi:10.1378/chest.101.6.1644.
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003, 29, 530–538, doi:10.1007/s00134-003-1662-x.
5. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016, 315, 801–810, doi:10.1001/jama.2016.0287.
6. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Critical Care Medicine* 49(11):1974-1982, November 2021.
7. Gauer R, Forbes D, Boyer N. Sepsis: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2020;101(7):409-418.
8. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med.* 2021 Nov;47(11):1181-1247.
9. Guarino M, Perna B, Cesaro AE, et al. 2023 Update on sepsis and septic shock in adult patients: management in the emergency department. *J Clin Med.* 2023 Apr 28;12(9):3188.
10. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 2020;395(10219):200-11.
11. Zimmerman JJ, Banks R, Berg RA, et al. Life After Pediatric Sepsis Evaluation (LAPSE) Investigators. Critical illness factors associated with long-term mortality and health-related quality of life morbidity following community-acquired pediatric septic shock. *Crit Care Med.* 2020;48(3):319-28.
12. Goldstein B, Giroir B, Randolph A; International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med.* 2005;6(1):2-8.
13. Gebara BM. Values for systolic blood pressure. *Pediatr Crit Care Med.* 2005;6(4):500.
14. Schlapbach LJ, Kissoon N. Defining pedi-atric sepsis. *JAMA Pediatr.* 2018;172(4):312–4.
15. Force IST; IDSA Sepsis Task Force. Infectious Diseases Society of America (IDSA) position statement: why IDSA cannot endorse the surviving sepsis campaign guidelines. *Clin Infect Dis.* 2018;66(10):1631–5.
16. Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children. *Intensive Care Med.* 2020;46(Suppl 1):10–67.
17. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):762-74.
18. Schlapbach LJ, Straney L, Alexander J, et al; ANZICS Paediatric Study Group. Mortality related to invasive infections, sepsis, and septic shock in critically ill children in Australia and New Zealand, 2002-13: a multicentre retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(1):46-54.
19. Watson RS, Carcillo JA, Linde-Zwirble WT, et al. The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(5):695-701.
20. de Souza DC, Gonçalves Martin J, Soares Lanziotti V, et al; SPREAD PED Investigators and the Instituto Latino Americano de Sepsis Network. The epidemiology of sepsis in paediatric intensive care units in Brazil (the Sepsis PREvalence Assessment Database in Pediatric population, SPREAD PED): an observational study. *Lancet Child Adolesc Health.* 2021;5(12):873-81.
21. Weiss SL, Fitzgerald JC, Pappachan J et al. Sepsis Prevalence, Outcomes, and Therapies (SPROUT) Study Investigators and Pediatric Acute Lung Injury and Sepsis Investigators (PALISI) Network. Global epidemiology of pediatric severe sepsis: the sepsis prevalence, outcomes, and therapies study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(10):1147-57.
22. Schlapbach LJ, Watson RS, Sorce LR et al. International Consensus Criteria for Pediatric Sepsis and Septic Shock. *JAMA.* 2024;331(8):665-74.
23. CLSI 2nd Edition. Principles and Procedures for Blood Cultures. M47-E. April 2022.
24. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013. *Clin Infect Dis* 2013;57(4):e22–e121.
25. Lalezari A, Cohen MJ, Svinik O, Tel-Zur O, Sinvani S, Al-Dayem YA, Block C, Moses AE, Oster Y, Salameh S, Strahilevitz J. A simplified blood culture sampling protocol for reducing contamination and costs: a randomized controlled trial. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Apr;26(4):470-474.
26. McKenzie SW, Means RT Jr. Blood Cultures and Culture Change. *Am J Med Sci.* 2019 Sep;358(3):171-172.

27. Towns ML, Jarvis WR, Hsueh PR. Guidelines on blood cultures. *J Microbiol Immunol Infect* 2010;43(4):347-9.
28. Baron EJ, Wienstein MP, Dunne WM, Yagupsky P, Welch DF, Wilson DM. Cumitech 1C. Blood Cultures IV. ASM Press, Washington, D.C., 2005.
29. Scheer CS, Fuchs C, Gründling M, Vollmer M, Bast J, Bohnert JA, Zimmermann K, Hahnenkamp K, Rehberg S, Kuhn SO. Impact of antibiotic administration on blood culture positivity at the beginning of sepsis: a prospective clinical cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Mar;25(3):326-331.
30. Woods WA. Sufficient Blood Culture Volume. *Pediatrics*. 2022 Jan 1;149(1):e2021055005C.
31. Smith L, Ali-Napo R, Ben-Zeev D, Olawuyi J. Optimizing Blood Culture Collection Volumes. *Am J Nurs*. 2023 Nov 1;123(11):53-56.
32. Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. Detection of bloodstream infections in adults: How many blood cultures are needed? *J Clin Microbiol* 2007;45(11):3546–3548.
33. De Plato F, Fontana C, Gherardi G et al. Collection, transport and storage procedures for blood culture specimens in adult patients: re-recommendations from a board of Italian experts. *Clin Chem Lab Med* 2019;57(11):1680–1689.
34. Huber S, Hetzer B, Crazzolara R, Orth-Höller D. The correct blood volume for paediatric blood cultures: a conundrum? *Clinical Microb Infections* 2020;26:168-173.
35. Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA on behalf of the ESCMIDStudy Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis (ESGBIES). Bloodstream infections – standard and progress in pathogen diagnostics. *Clin Microbiol Infect* 2020; 26:142-150.
36. Idelevich, EA, Seifert, H., Sundqvist i sur. Microbiological diagnostics of bloodstream infections in Europe - An ESGBIES survey. *Clin Microbiol Infect* 2019;25(11):1399-1407.
37. Friedman ND, Braun T, Fallach N, Carmeli Y. Blood Culture Sampling Practices among Internal Medicine Inpatients. *Clin Microbiol Infect Dis* 2017;2(1):1–6.
38. Shapiro NI, Wolfe RE, Wright SB, Moore R, Bates DW. Who Needs a Blood Culture? A Prospectively Derived and Validated Prediction Rule. *J Emerg Med* 2008;35(3):255–264.
39. Choi J, Esafi S, Chartier LB, van Praet. A quality improvement initiative to decrease the rate of solitary blood cultures in the emergency department. *Acad Emerg Med* 2017; 24:1080-1087.
40. WHO. WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy. World Health Organization 2010;1–105.
41. Benjamin RJ, Dy B, Warren R, Lischka M, Eder AF. Skin disinfection with a single-step 2% chlorhexidine swab is more effective than a two-step povidone-iodine method in preventing bacterial contamination of apheresis platelets. *Transfusion* 2011;51:531–538.
42. Revell P, Doern C. Pediatric blood cultures. U: Dunne Jr WM, Burnham C-AD, ur. The dark art of blood cultures. Washington, DC: ASM Press; 2017, str. 151-62.
43. Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti J-J, Tattevin P. How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the-art. *Front Microbiol* 2016; 7:697.
44. Ford C, Park LJ. How to apply and remove medical gloves. *Br J Nurs* 2019;28(1):26–28
45. Lamy B, Roy P, Carret G, Flandrois J, Delignette-Muller ML What Is the Relevance of Obtaining Multiple Blood Samples for Culture? A Comprehensive Model to Optimize the Strategy for Diagnosing Bacteremia. *Clin Infect Dis* 2002;35(7):842–850.
46. Liu W, Duan Y, Cui W et al. Skin antiseptics in venous puncture site disinfection for preventing blood culture contamination: a Bayesian network meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Nurs Stud* 2016;59:156–162.
47. Leber AL. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th Edition. 2016.
48. Bengtsson J, Wahl M, Lursson P. Assessment of the BacT/Alert blood culture system : rapid bacteremia diagnosis with loading throughout the 24 h. *Clin Microbiol Infect* 1993;4(1):33-37.
49. Jacobs MR, Mazzulli T, Hazen KC, Good CE, Abdelhamed AM, Lo P, Shum B, Roman KP, Robinson DC. Multicenter Clinical Evaluation of BacT/Alert Virtuo Blood Culture System. *J Clin Microbiol*. 2017 Aug;55(8):2413-2421.
50. Guo Z. Impact of satellite blood culture on early diagnosis of sepsis. *Journal of Intensive Medicine* 2022,2(1), 56–60.
51. Rocchetti A, et al. Implementation of satellite blood-culture system in an emergency department: Impact of time-to results in sepsis detection. *Microbiologia Medica*, 2016,31(2). doi:10.4081/mm.2016.5859.
52. Ransom EM, Burnham CD. Routine Use of Anaerobic Blood Culture Bottles for Specimens Collected from Adults and Children Enhances Microorganism Recovery and Improves Time to Positivity. *J Clin Microbiol*. 2022 Sep 21;60(9):e0050022.
53. Chung Y, Kim IH, Han M, Kim HS, Kim HS, Song W, Kim JS. A comparative evaluation of BACT/ALERT FA PLUS and FN PLUS blood culture bottles and BD BACTEC Plus Aerobic and Anaerobic blood culture bottles for antimicrobial neutralization. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Dec;38(12):2229-2233.
54. Chung Y, Kim IH, Han M, Kim HS, Kim HS, Song W, Kim JS. A comparative evaluation of BACT/ALERT FA PLUS and FN PLUS blood culture bottles and BD BACTEC Plus Aerobic and Anaerobic blood culture bottles for antimicrobial neutralization. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Dec;38(12):2229-2233.
55. Tomazin R, Pliberšek T, Oštrbenk Valenčak A, Matos T. Different BD BACTEC() Blood Culture Bottle Types for the Detection of Fungi in Simulated Sterile Body Fluid Samples. *Diagnostics (Basel)*. 2023 May 11;13(10):1699.
56. Magallon A, Basmacıyan L, Chapuis A, Valot S, Sautour M, Bador J, Dalle F. Evaluation of the relevance of use of the BD-BACTEC MycosisIC/F, BD-BACTEC Plus Aerobic/F, BD-BACTEC Lytic/10 anaerobic/F and BD-BACTEC Peds Plus/F culture bottle system for fungemia detection: A 4-year retrospective study at the Dijon university hospital, France. *J*

57. Ombelet S, Natale A, Ronat JB, Kesteman T, Vandenberg O, Jacobs J, Hardy L. Biphasic versus monophasic manual blood culture bottles for low-resource settings: an in-vitro study. *Lancet Microbe*. 2022 Feb;3(2):e124-e132.
58. Ombelet S, Barbé B, Affolabi D, Ronat JB, Lompo P, Lunguya O, Jacobs J, Hardy L. Best Practices of Blood Cultures in Low- and Middle-Income Countries. *Front Med (Lausanne)*. 2019 Jun 18;6:131.
59. Cockerill FR, Wilson JW, Vetter EA et al. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis* 2004;38:1724–1730.
60. Florio W, Morici P, Ghelardi E, Barnini S, Lupetti A. Recent advances in the microbiological diagnosis of bloodstream infections. *Crit Rev Microbiol* 2018;44(3):351–370.
61. Uehara Y, Yagoshi M, Tanimichi Y et al. Impact of reporting gram stain results from blood culture bottles on the selection of antimicrobial agents. *Am J Clin Pathol* 2009; 132(1):18–25.
62. Chela HK, Vasudevan A, Rojas-Moreno C, Naqvi SH. Approach to Positive Blood Cultures in the Hospitalized Patient: A Review. *Mo Med*. 2019 Jul-Aug;116(4):313-317.
63. Aronson MD, Bor DH. Blood cultures. *Ann Int Med* 1987;106(14): :246-253.
64. Chandrasekar PH, Brown WJ. Clinical issues of blood cultures. *Arch Inter Med* 1994;154(4): 841-849.
65. Özenci V, Tegmark-Wisell K, Lundberg C, Wretling B Rapid culture and identification: A practical method for early preliminary laboratory diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(2): 177–180 Blot F, Nitenberg GE, Chachaty E et al. Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures. *Lancet* 1999;354(9184):1071–1077.
66. Kristóf K, Pongrácz J. Interpretation of blood microbiology results – function of the clinical microbiologist. *EJIFCC* 2016;27(2):147–55.
67. Funke G, Funke-Kissling P. Use of the BD PHOENIX Automated Microbiology System for direct identification and susceptibility testing of gram-negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial. *J Clin Microbiol*. 2004 Apr;42(4):1466-70.
68. Yonetani S, Okazaki M, Araki K, Makino H, Fukugawa Y, Okuyama T, Ohnishi H, Watanabe T. Direct inoculation method using Bact/ALERT 3D and BD Phoenix System allows rapid and accurate identification and susceptibility testing for both Gram-positive cocci and Gram-negative rods in aerobic blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Jun;73(2):129-34.
69. Thelen P, Graeber S, Schmidt E, Hamprecht A.A side-by-side comparison of the new VITEK MS PRIME and the MALDI Biotyper sirius in the clinical microbiology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2023 Nov;42(11):1355-1363.
70. Bazzi AM, Rabaan AA, El Edaily Z, John S, Fawarah MM, Al-Tawfiq JA. Comparison among four proposed direct blood culture microbial identification methods using MALDI-TOF MS. *J Infect Public Health*. 2017 May-Jun;10(3):308-315.
71. Peras M, Mareković I, Kuliš T, Markanović M, Budimir A. Comparison of Zybion Kit and saponin in-house method in rapid identification of bacteria from positive blood cultures by EXS2600 matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system. *J Mass Spectrom*. 2024 Sep;59(9):e5080.
72. Cenci E, Paggi R, Socio GV, Bozza S, Camilloni B, Pietrella D, Mencacci A. Accelerate Pheno blood culture detection system: a literature review. *Future Microbiol*. 2020 Oct;15:1595-1605.
73. De Socio GV, Belati A, Paggi R, D'Arpino A, Moretti A, Allegrucci F, Cenci E, Francisci D, Mencacci A. Accelerate Pheno system in sepsis by Gram-negative pathogens: four months of hospital experience. *New Microbiol*. 2020 Jan;43(1):6-12.
74. Berinson B, Both A, Berneking L, Christner M, Lütgehetmann M, Aepfelbacher M, Rohde H. Usefulness of BioFire FilmArray BCID2 for Blood Culture Processing in Clinical Practice. *J Clin Microbiol*. 2021 Jul 19;59(8):e0054321.
75. Parkes-Smith J, Bergh H, Harris PNA. Assessing the performance of the Cepheid Xpert in identifying and differentiating methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from blood culture bottles. *Pathology*. 2023 Feb;55(1):113-116.
76. Kamm W, Wenger A, Bille J. Evaluation of the Cobas-Bact system for direct and rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative rods from positive blood culture broths. *J Clin Microbiol*. 1989 Jan;27(1):102-5.
77. Liang F, Browne DJ, Gray MJ, Gartlan KH, Smith DD, Barnard RT, Hill GR, Corrie SR, Markey KA. Development of a Multiplexed Microsphere PCR for Culture-Free Detection and Gram-Typing of Bacteria in Human Blood Samples. *ACS Infect Dis*. 2018 May 11;4(5):837-844.
78. Both A, Christner M, Berinson B, Dreimann M, Viezens L, Lütgehetmann M, Aepfelbacher M, Rohde H, Stangenberg M. The added value of a commercial 16S/18S-PCR assay (UMD-SelectNA, Molzym) for microbiological diagnosis of spondylodiscitis: an observational study. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2023 May;106(1):115926.
79. Bach K et al. Performance of the eazypex® BloodScreen GN as a simple and rapid molecular test for identification of Gram-negative bacteria from positive blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2022 Mar;41(3):489-494.
80. Sandra Christina Burrack-Lange et al. Multicenter assessment of the rapid Unyvero Blood Culture molecular assay. *J Med Microbiol*. 2018 Sep;67(9):1294-1301.
81. <https://www.eucast.org/>
82. <https://clsi.org/>
83. Riccobono E, Aiezza N, Nicolai C, Giani T, Rossolini GM. Evaluation of VITEK 2 AST cards (AST-N376 and AST-N397) for susceptibility testing of challenging Gram negatives. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2023 Oct;107(2):116032.
84. Donaldson H, McCalmont M, Livermore DM, Rooney PJ, Ong G, McHenry E, Campbell R, McMullan R. Evaluation of the VITEK 2 AST N-054 test card for the detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* with CTX-M phenotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Nov;62(5):1015-7.

85. Murata M, Kosai K, Akamatsu N, Matsuyama Y, Oda M, Wakamatsu A, Izumikawa K, Mukae H, Yanagihara K. Diagnostic Performance of BD Phoenix CPO Detect Panels for Detection and Classification of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. *Microbiol Spectr*. 2023 Jun 15;11(3):e0089723.
86. Hong JS, Kim D, Kang DY, Park BY, Yang S, Yoon EJ, Lee H, Jeong SH. Evaluation of the BD Phoenix M50 Automated Microbiology System for Antimicrobial Susceptibility Testing with Clinical Isolates in Korea. *Microb Drug Resist*. 2019 Oct;25(8):1142-1148.
87. Charnot-Katsikas A, Tesic V, Love N, Hill B, Bethel C, Boonlayangoor S, Beavis KG. Use of the Accelerate Pheno System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Pathogens in Positive Blood Cultures and Impact on Time to Results and Workflow. *J Clin Microbiol*. 2017 Dec 26;56(1):e01166-17.
88. Tibbetts R, George S, Burwell R, Rajeev L, Rhodes PA, Singh P, Samuel L. Performance of the Reveal Rapid Antibiotic Susceptibility Testing System on Gram-Negative Blood Cultures at a Large Urban Hospital. *J Clin Microbiol*. 2022 Jun 15;60(6):e0009822.
89. Lutgring JD, Bittencourt C, McElvania TeKippe E, Cavuoti D, Hollaway R, Burd EM. Evaluation of the Accelerate Pheno System: Results from Two Academic Medical Centers. *J Clin Microbiol*. 2018 Mar 26;56(4):e01672-17.
90. Wong AYW, Johnsson ATA, Özenci V. Performance of dRAST on Prospective Clinical Blood Culture Samples in a Simulated Clinical Setting and on Multidrug-Resistant Bacteria. *Microbiol Spectr*. 2022 Apr 27;10(2):e0210721.
91. Opota O, Jatón K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin Microbiol Infect* 2015;21(4):323–331.
92. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(3):444-465.
93. van Belkum A, Burnham CD, Rossen JWA, Mallard F, Rochas O, Dunne WM Jr. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. *Nat Rev Microbiol*. 2020 May;18(5):299-311.
94. Briggs N, Campbell S, Gupta S. Advances in rapid diagnostics for bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021 Jan;99(1):115219.
95. Peri AM, Harris PNA, Paterson DL. Culture-independent detection systems for bloodstream infection. *Clin Microbiol Infect*. 2022 Feb;28(2):195-201.
96. Zacharioudakis IM, Zervou FN, Mylonakis E. T2 Magnetic Resonance Assay: Overview of Available Data and Clinical Implications. *J Fungi (Basel)*. 2018 Apr 4;4(2):45.
97. Böhlke M, Uliano G, Barcellos FC. Hemodialysis catheter-related infection: prophylaxis, diagnosis and treatment. *J Vasc Access*. 2015;16(5):347–355.
98. Mushtaq A, Bredell BX, Soubani AO. Repeating blood cultures after initial bacteremia: When and how often? *Clev Clin J Med* 2019; 86 (2): 89-92.
99. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. *Clin Infect Dis*. 2005 Dec 1;41(11):1677-80. doi: 10.1086/497595.
100. Larson AM, Dougherty MJ, Nowowiejski DJ, Welch DF, Matar GM, Swaminathan B, Coyle MB. Detection of *Bartonella (Rochalimaea) quintana* by routine acridine orange staining of broth blood cultures. *J Clin Microbiol*. 1994 Jun;32(6):1492-6. doi: 10.1128/jcm.32.6.1492-1496.1994.
101. Liesman RM, Pritt BS, Maleszewski JJ, Patel R. Laboratory Diagnosis of Infective Endocarditis. *J Clin Microbiol*. 2017 Sep;55(9):2599-2608. doi: 10.1128/JCM.00635-17.
102. Slater LN, Welch DF, Hensel D, Coody DW. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N Engl J Med*. 1990 Dec 6;323(23):1587-93. doi: 10.1056/NEJM199012063232303.
103. Yagupsky P. Detection of *Brucellae* in blood cultures. *J Clin Microbiol*. 1999 Nov;37(11):3437-42. doi: 10.1128/JCM.37.11.3437-3442.1999.
104. Nielsen H, Hansen KK, Gradel KO, Kristensen B, Ejlersen T, Østergaard C, Schønheyder HC. Bacteraemia as a result of *Campylobacter* species: a population-based study of epidemiology and clinical risk factors. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Jan;16(1):57-61. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02900.x.
105. Haristoy X, Lozniewski A, Tram C, Simeon D, Bevanger L, Lion C. *Francisella tularensis* bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2774-6. doi: 10.1128/JCM.41.6.2774-2776.2003.
106. Araoka H, Baba M, Kimura M, Abe M, Inagawa H, Yoneyama A. Clinical characteristics of bacteremia caused by *Helicobacter cinaedi* and time required for blood cultures to become positive. *J Clin Microbiol*. 2014 May;52(5):1519-22. doi: 10.1128/JCM.00265-14.
107. Rihs JD, Yu VL, Zuravleff JJ, Goetz A, Muder RR. Isolation of *Legionella pneumophila* from blood with the BACTEC system: a prospective study yielding positive results. *J Clin Microbiol*. 1985 Sep;22(3):422-4. doi: 10.1128/jcm.22.3.422-424.1985.
108. Palmer MF, Zochowski WJ. Survival of leptospirae in commercial blood culture systems revisited. *J Clin Pathol*. 2000 Sep;53(9):713-4. doi: 10.1136/jcp.53.9.713.
109. Waites KB, Canupp KC. Evaluation of BacT/ALERT system for detection of *Mycoplasma hominis* in simulated blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2001 Dec;39(12):4328-31. doi: 10.1128/JCM.39.12.4328-4331.2001.
110. Grace CJ, Lieberman J, Pierce K, Littenberg B. Usefulness of blood culture for hospitalized patients who are receiving antibiotic therapy. *Clin Infect Dis*. 2001 Jun 1;32(11):1651-5. doi: 10.1086/320527.

111. Gould FK, Denning DW, Elliott TS, Foweraker J, Perry JD, Prendergast BD, Sandoe JA, Spry MJ, Watkin RW, Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. 2012. Guidelines for the diagnosis and antibiotic treatment of endocarditis in adults: a report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 67:269–289. doi: 10.1093/jac/dkr450.
112. Fida I, M.; Dylla, B.L.; Sohail, M.R.; Pritt, B.S.; Schuetz, A.N.; Patel, R. Role of prolonged blood culture incubation in infective endocarditis diagnosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019, 38, 197–198.
113. Rubinstein E, Lang R. Fungal endocarditis. *Eur Heart J.* 1995 Apr;16 Suppl B:84-9. doi: 10.1093/eurheartj/16.suppl_b.84.
114. McDonald LC, Weinstein MP, Fune J, Mirrett S, Reimer LG, Reller LB. Controlled comparison of BacT/ALERT FAN aerobic medium and BATEC fungal blood culture medium for detection of fungemia. *J Clin Microbiol.* 2001 Feb;39(2):622-4. doi: 10.1128/JCM.39.2.622-624.2001.
115. International Organization for Standardization. ISO 15189. Medical laboratories - Requirements for quality and competence, Institut za standardizaciju Srbije, Beograd, 2023.
116. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241548274> (pristupljeno 28.8.2024)
117. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, Gonzalez MD, Jerris RC, Kehl SC, Patel R, Pritt BS, Richter SS, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Snyder JW, Telford S 3rd, Theel ES, Thomson RB Jr, Weinstein MP, Yao JD. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis.* 2018;67(6):e1-e94. doi: 10.1093/cid/ciy381.
118. Weinstein MP, Mirrett S, Wilson ML, Reimer LG, Reller LB. Controlled evaluation of 5 versus 10 milliliters of blood cultured in aerobic BacT/Alert blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 1994;32(9):2103-6. doi: 10.1128/jcm.32.9.2103-2106.1994.
119. Dawson S. Blood culture contaminants. *J Hosp Infect.* 2014;87(1):1-10. doi: 10.1016/j.jhin.2014.02.009.
120. Leber A. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th ed. Washington: ASM Press; 2016.
121. Mangioni D, Peri AM, Rossolini GM, Viaggi B, Perno CF, Gori A, Bandera A. Toward Rapid Sepsis Diagnosis and Patient Stratification: What's New From Microbiology and Omics Science. *J Infect Dis.* 2020;221(7):1039-1047. doi: 10.1093/infdis/jiz585.
122. Richter SS, Beekmann SE, Croco JL, Diekema DJ, Koontz FP, Pfaller MA, Doern GV. Minimizing the workup of blood culture contaminants: implementation and evaluation of a laboratory-based algorithm. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2437-44. doi: 10.1128/JCM.40.7.2437-2444.2002.
123. Gilligan PH. Blood culture contamination: a clinical and financial burden. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(1):22-3. doi: 10.1086/668771.
124. Lamy B, Ferroni A, Henning C, Cattoen C, Laudat P. How to: accreditation of blood cultures' proceedings. A clinical microbiology approach for adding value to patient care. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24:956-963.

Srpsko udruženje za kliničku mikrobiologiju
Vodič za mikrobiološku dijagnostiku sepse
Ćirković I. i saradnici
Beograd, 2024. godine
ISBN: 978-86-906584-1-1
CIP - 616.94-074(083.1) (Katalogizacija u publikaciji Narodna biblioteka Srbije, Beograd)



Srpsko udruženje za kliničku mikrobiologiju
SUKM

SRPSKO UDRUŽENJE ZA KLINIČKU MIKROBIOLOGIJU

VODIČ ZA MIKROBIOLOŠKU DIJAGNOSTIKU SEPSE

ĆIRKOVIĆ I. I SARADNICI

BEOGRAD, 2024.GODINE

ISBN 978-86-906584-1-1



9 788690 658411