Ispitivanje utjecaja volumena krvi na vrijeme detekcije pozitiviteta u sustavu za kontinuirano praćenje hemokultura

Čamber, Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:064062

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Magdalena Čamber

ISPITIVANJE UTJECAJA VOLUMENA KRVI NA VRIJEME DETEKCIJE POZITIVITETA U SUSTAVU ZA KONTINUIRANO PRAĆENJE HEMOKULTURA

Diplomski rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Magdalena Čamber

ISPITIVANJE UTJECAJA VOLUMENA KRVI NA VRIJEME DETEKCIJE POZITIVITETA U SUSTAVU ZA KONTINUIRANO PRAĆENJE HEMOKULTURA

Diplomski rad

Osijek, 2023.

Rad je ostvaren u: Zavod za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije, Klinički bolnički centar Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Maja Bogdan, dr. med.

Rad sadrži 41 stranicu, 14 tablica i 16 slika.

Zahvala

Prije svega, najiskrenije zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Maji Bogdan na izdvojenom vremenu, usmjeravanju te prenesenom znanju i pomoći tijekom izrade ovoga rada.

Hvala mojoj cijeloj obitelji, a najviše ocu Ivici, majci Suzani te braći Domagoju, Antoniju i Karlu, na velikom strpljenju, beskrajnoj ljubavi i podršci koju su mi pružali tijekom studija. Sve što danas jesam, dugujem vama.

Mojim dragim prijateljicama, koji su svaki dan nesebično uveselile, od srca hvala.

Anti, na svemu onom što jest i na svemu što mi pruža, beskrajno sam zahvalna.

SADRŽAJ

1. UVOD II

1.1 Bakterijemija 1

1.2 Infekcije krvotoka (BSI) i sepsa 1

1.3 Mikrobiološka analiza – Hemokultura 2

1.3.1 Uzimanje uzoraka hemokultura 3

1.3.2 Analiza uzoraka hemokultura 5

2. CILJEVI 10

3. MATERIJALI I METODE 11

3.1. Ustroj studije 11

3.2. Ispitanici 11

3.3. Metode 11

3.4. Statističke metode 16

4. REZULTATI 17

5. RASPRAVA 32

6. ZAKLJUČAK 35

7. SAŽETAK 36

8. SUMMARY 37

9. LITERATURA 38

10. ŽIVOTOPIS 41

POPIS KRATICA

BSI – infekcije krvotoka (engl. *bloodstream infections*)

CFU – jedinice koje stvaraju kolonije (engl. *colony forming unit*)

CMBCS – sustav za kontinuirano praćenje hemokultura (engl. *continuous monitoring blood culture system*)

FDA – Uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration)*

FISH – fluorescentna in-situ hibridizacija (engl. *fluorescence in-situ hybridization)*

KNS – koagulaza negativni stafilokoki (engl. *koagulase-negative Staphylococcus)*

MALDI-TOF – matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom s masenim spektrometrom s vremenom proleta (engl. *Matrix Assisted LASER Desorption/lonization Time Of Flight Mass Spectrometry*)

MRKNS – meticilin rezistentni koagulaza negativni stafilokoki (engl. *Methicillin-resistant koagulase-negative Staphylococcus)*

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction)*

SBF – simulirana tjelesna tekućina *(*engl. *simulated body fluid*)

SPS – Natrijev polianetol sulfonat (engl. *sodium polyanethole sulphonate)*

TTP – vrijeme do detekcije pozitiviteta (engl. *time to positivity)*

1. UVOD

1.1 Bakterijemija

Bakterijemija, stanje koje se opisuje kao prisustvo bakterija u krvi, važan je uzrok morbiditeta i mortaliteta u bolesnika (1). Također, zbog visoke stope smrtnosti u djece i odraslih (30 – 50%) važna briga u kliničkoj medicini je i fungemija, u najvećem slučaju kandidemija, prisutnost blastokonidija Candida spp. u krvotoku. Najčešći izvori bakterijemije i kandidemije su intravaskularni kateteri, prethodne infekcije, dugotrajna hospitalizacija u Jedinici intenzivnog liječenja, parenteralna prehrana te imunosupresija. Kod značajnog dijela bolesnika (oko 20%) izvor bakterijemije nije poznat (2). Bakterijemija se može se pojaviti kao nekomplicirana (prolazna) i komplicirana (povremena i trajna) (3). Prolazna bakterijemija javlja se kao asimptomatska, a uzrok mogu biti čak i normalne dnevne aktivnosti kao što su provođenje dentalne higijene ili neke manje dentalne ili medicinske intervencije koje kod klinički zdravih osoba ne uzrokuju teške infekcije s još težim posljedicama (1). Takve prolazne bakterijemije obično traju nekoliko minuta do par sati nakon čega spontano nestaju pomoću funkcionalnog mononuklearnog fagocitnog sustava, gdje se bakterije uklone iz krvi fagocitozom u jetri i slezeni. Međutim, stalno otpuštanje ogromnog broja bakterija u krvotok može nadvladati imunološki sustav domaćina te kulminirati u klinički značajnu bakterijemiju (3). U slučaju da imunološki sustav, iz bilo kojeg razloga zakaže ili postane preopterećen, bakterijemija može prijeći u infekciju krvotoka (BSI – engl. *bloodstream infections*) te, ako je neliječena, može dalje napredovati do sindroma sistemskog upalnog odgovora (SIRS, engl. *systemic inflammatory response syndrome*), sepse, septičkog šoka i sindroma disfunkcije više organa (MODS, engl. *multiple organ dysfunction syndrome*) (1).

1.2 Infekcije krvotoka (BSI) i sepsa

U Europi se svake godine prijavi više od milijun slučajeva infekcije krvotoka, što ukazuje na samu težinu tog zdravstvenog problema (4). Uzrok infekcije su mikroorganizmi, odnosno, bakterije (uključujući mikobakterije), virusi, gljive i paraziti. BSI mogu biti endogene, kada je mikroorganizam (u velikom slučaju bakterija) sastavni dio autohtone flore osobe, a u krvotok može ući kroz kožu ili barijeru sluznice nakon određene traume ili operacije; te egzogene infekcije, gdje je uzrok mikroorganizam iz okoliša, tla, vode, životinja ili druge osobe (5).

Uznapredovala i neliječena BSI dovodi naposljetku do stanja sepse, od koje se u Europi bilježi čak 157 000 smrtnih slučajeva godišnje (6). Sepsa se definira kao stanje u kojem je odgovor domaćina na infekciju nereguliran te uzrokuje oštećenje i disfunkciju organa. Nadalje, dovodi do teških kliničkih i patofizioloških posljedica koje rezultiraju progresivnim zatajenjem više međusobno ovisnih organskih sustava (7). Odgođena terapija povezuje se s lošijim ishodom, tako da brza i točna dijagnoza ima velik značaj za preživljenje pacijenta (4).

Dijagnoza se temelji na detaljnoj anamnezi pacijenta, fizikalnom pregledu, radiološkim i laboratorijskim pretragama, čiji rezultati omogućuju liječniku da zatraži mikrobiološku analizu koja bi potvrdila da je uzrok infekcije mikroorganizam (5).

1.3 Mikrobiološka analiza – Hemokultura

Sposobnost brze identifikacije invazivnih patogena od velike je važnosti za odabir adekvatne terapije jer primjena učinkovitog antibiotika uvelike ovisi o poznavanju identiteta mikroorganizma te njegove osjetljivosti na antibiotike (8). Upravo ta detekcija i karakterizacija mikroorganizma koji je uzrokovao infekciju krvotoka jest jedna od najvažnijih funkcija kliničkog mikrobiološkog laboratorija (9).

Hemokultura ostaje najbolji pristup, tzv. „zlatni standard“ za identifikaciju patogenih mikroorganizama kada se sumnja na infekciju krvotoka i sepsu te je također jamstvo da je antimikrobna terapija odgovarajuća. Osim za prilagodbu antimikrobne terapije, hemokulture imaju veliku važnost i u smanjenju spektra terapije kako bi se izbjegla pojavnost rezistentnih sojeva. Jedan od razloga zašto hemokultura predstavlja glavnu metodu za određivanje etiologije infekcija krvotoka jest taj što je metoda jako osjetljiva i uz to jednostavna za izvođenje. Uzorak krvi dobiva se venepunkcijom za odrasle do 20 mL krvi koja se inokulira u dvije bočice, tzv. set hemokultura koji se sastoji od jedne aerobne i jedne anaerobne bočice. Standardne bočice za hemokulturu dizajnirane su tako da su namijenjene za inokulaciju do 10 mL krvi, a sadrže bogatu podlogu optimalnu za rast u aerobnim, odnosno anaerobnim uvjetima. U slučaju da se sumnja na fungemiju set hemokultura može se sadržavati od tri bočice, gdje je uz aerobnu i anaerobnu dodana i bočica posebno namijenjena za praćenje porasta gljiva. Prije započinjanja primjene antimikrobne terapije potrebno je uzeti dvije do četiri hemokulture, što bi značilo da krajnji volumen krvi koji je potreban za analizu iznosi 40 – 80 mL. Za djecu i novorođenčad, zbog poteškoća u dobivanju veće količine krvi set

hemokultura čini jedna pedijatrijska bočica namijenjena za kulturu volumena < 3 mL krvi (10).

1.3.1 Uzimanje uzoraka hemokultura

Kad se sumnja da pacijent ima bakterijemiju ili sepsu, odnosno kad postoje simptomi koji ukazuju na moguću infekciju krvotoka treba uzeti uzorak hemokulture. Simptomi koji se mogu javiti su vrućica, zimica, tresavica, lokalne bakterijske infekcije (npr. endokarditis), povišeni otkucaji srca, nizak ili visok krvni tlak te ubrzano disanje (12).

Do sada, većina smjernica preporučuje da se uzorak hemokulture uzme prije primjene antimikrobnih lijekova (ili neposredno prije sljedeće doze terapije) te u vrijeme skokova vrućice ili oko tog vremena, a preporučuje se također i interval od 30 – 60 min između uzorkovanja. Vremenski interval između setova nije kritički čimbenik jer nema značajan utjecaj na osjetljivost metode, ona ostaje ista bilo da se dva seta hemokultura uzimaju u isto vrijeme ili s razmakom. Bitan čimbenik je uzorkovanje neposredno prije primjene antimikrobne terapije, u tom slučaju osjetljivost je znatno veća (12).

Metoda izbora za uzimanje hemokultura je periferna venepunkcija. U usporedbi s uzimanjem krvi kroz intravaskularni kateter gdje stopa kontaminacije iznosi 3 – 13 %, kad se uzorci hemokulture dobiju perifernom venepunkcijom stopa kontaminacije je 1 – 7 %, što ukazuje na adekvatnost ove metode. Primjena antiseptične tehnike tijekom cijelog postupka venepunkcije najvažniji je čimbenik za smanjenje rizika od kontaminacije (12). Unatoč pravilnom aseptičnom rukovanju, u 1 – 3 % hemokultura ipak dođe do kontaminacije, odnosno porasta mikroorganizama koji nisu prisutni u krvi bolesnika. Kontaminanti najčešće dospiju u hemokulturu prilikom uzimanja uzorka tako da su uobičajeni kontaminanti zapravo kožni mikroorganizmi kao što su koagulaza negativni stafilokoki (KNS). Međutim, iako pojava ovih mikroorganizama često predstavlja kontaminaciju i dovodi do lažno pozitivnog rezultata, nalaz je potrebno dodatno ispitati prije nego se isključi prisustvo prave bakterijemije. Pojavnost kontaminacije hemokulture može rezultirati naposljetku netočnom dijagnozom, nepotrebnom primjenom antimikrobne terapije te povećanim opterećenjem na zdravstveni sustav. Uz aseptičnu tehniku i proceduru uzorkovanja, inokulacija neadekvatnog volumena krvi u bočicu za hemokulturu također je povezana s rizikom od kontaminacije hemokulture (13).

Volumen krvi koja se prikupi za hemokulturu najvažnija je varijabla za detekciju mikroorganizama te samim tim i za otkrivanje bakterijemije ili kandidemije u krvi. On ima direktan utjecaj na osjetljivost hemokulture. Broj mikroorganizama po mililitru periferne krvi može biti vrlo nizak, u nekim slučajevima manji od 1×10^3 CFU (engl. *colony forming unit*- jedinice koje stvaraju kolonije) po litru krvi, a osjetljivost metode iznosi 95 % kada je koncentracija bakterija u uzorku 3×10^3 CFU/ L, zbog čega zapravo i stoji preporuka da je optimalno uzeti 2 do 4 seta hemokultura, odnosno 40 – 80 mL krvi, pod pretpostavkom da su bočice adekvatno napunjene (12). Volumen prikupljene krvi može se povećati tako što bi se, umjesto 20 mL krvi raspodijeljene u dvije bočice (aerobnu i anaerobnu), prikupilo 30 mL krvi koja bi se raspodijelila u tri bočice (dvije aerobne i jednu anaerobnu), što bi povećalo osjetljivost analize bez značajnog povećanja troškova. Za pacijente s neutropenijom te za pacijente čija je tjelesna težina manja od 40 kg vrijedi preporuka da krv koja je prikupljena za hemokulturu ne iznosi više od 1 % ukupnog volumena krvi pacijenta (9). Za novorođenčad i dojenčad uvedene su manje bočice za hemokulturu pomoću kojih je u malom volumenu krvi i u aerobnim uvjetima moguć optimalan rast najčešćih patogena. Uzročnici infekcija kod djece najčešće su aerobi, dok se anaerobna bakterijemija javlja u manje od 1 % infekcija krvotoka pedijatrijskih pacijenata (13). U slučaju da se odrasloj osobi izvadi manji volumen krvi od preporučenog volumena, prvo se inokulira aerobna bočica s preporučenim volumenom krvi, a ostatak se inokulira u anaerobnu bočicu. Nedovoljno napunjene bočice mogu dovesti do lažno negativnih rezultata. S druge strane, kada se bočica napuni s više od 10 mL veća je šansa da će se javiti lažni pozitivitet (12).

Kako bi se osigurala optimalna osjetljivost metode, uzorkovanje odgovarajućeg volumena može se postići na dva načina: povećanjem broja venepunkcija (višestruka venepunkcija s različitih mjesta) te prikupljanjem većeg volumena kroz jednu punkciju (jednokratna punkcija). Pristup višestruke venepunkcije temelji se na pretpostavkama da ponavljanje uzorkovanja osigurava veću osjetljivost jer se prikuplja veći volumen, zatim da se u uzorcima uzetih s različitih mjesta može lakše razlučiti što je kontaminanta, a što patogen te da uzorci uzeti u određenim vremenskim intervalima mogu poboljšati otkrivanje intermitentne infekcije krvotoka. Međutim, prikupljanje krvi jednom venepunkcijom osigurava jednaku osjetljivost jer je ukupni volumen jednak. Prednosti jednostruke venepunkcije su smanjena stopa kontaminacije tijekom uboda, smanjeno radno opterećenje, ranija primjena antimikrobne terapije te smanjenje broja invazivnih postupaka, a samim time i povećanje udobnosti za pacijenta (12).

1.3.2 Analiza uzoraka hemokultura

Posljednjih godina napravljena su poboljšanja u dijagnostici kako bi se povećale osjetljivost i specifičnost, a smanjilo vrijeme potrebno za identifikaciju mikroorganizma iz hemokulture (10).

Bočice za hemokulturu obično se razlikuju po udjelu i vrsti dodataka i antikoagulansa, volumenu bujona i sastavu atmosfere iznad njega te po prisutnost spojeva čije djelovanje neutralizira antimikrobne tvari (14). Većina modernih formulacija je slična, obično je baza triptikaza sojin bujon, a kao antikoagulans najčešće natrijev polianetol sulfonat (SPS) (9). SPS podržava rast većine bakterija tako što inhibira baktericidni učinak seruma iz krvi, zatim inhibira fagocitozu stanica te inaktivira komplement i lizozim. S druge strane, on može inhibirati rast nekih bakterija kao što su *Neisseria spp,. Capnocytophaga spp.*, i anaerobni koki. Njegova koncentracija u bočici za hemokulturu varira od 0,0125 % do 0,05 % ovisno koji je proizvođač. Medij za hemokulturu sadrži i razne adsorbense kao što je ugljen ili kationska izmjenjivačka smola. Uloga tih adsorbensa je neutralizacija antibiotika unesenih iz bolesnikove krvi (14). Atmosfera iznad bujona sastoji se od ugljikovog dioksida (CO_2) i dušika (N_2) za anaerobne bočice, odnosno od okolnog zraka obogaćenog ugljikovim dioksidom za aerobne bočice. Anaerobne bočice također sadrže i redukcijske agense (9). Da bi se uklonilo antibakterijsko djelovanje seruma ljudske krvi, omjer krvi i bujona koji potreban iznosi 1 : 15, odnosno, 1 : 5 ili 1 : 10 s dodatkom 0,05% SPS. Ukoliko omjer krvi i bujona, tj. volumen krvi nije adekvatan, može doći do lažnih rezultata (14).

Uvođenje sustava za kontinuirano praćenje hemokulture 1990-tih godina dovelo je do poboljšanja u standardizaciji dijagnostike (11). Također, uvođenje MALDI- TOF metode (engl. *Matrix Assisted LASER Desorption/lonization Time Of Flight Mass Spectrometry* - matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom s masenim spektrometrom s vremenom proleta) u kliničke mikrobiološke laboratorije uvelike je unaprijedilo identifikaciju mikroorganizama, dok je uvođenje metoda temeljenih na nukleinskim kiselinama (npr. multiplex PCR ili FISH s PNA probama) znatno smanjilo vrijeme do dobivanja rezultata (10).

Poboljšanja u inkubaciji i praćenju hemokultura rezultirala su uvođenjem sustava za kontinuirano praćenje hemokultura (CMBCS, engl. *continuous monitoring blood culture system*) (9). Primjena tih sustava u usporedbi s manualnom obradom povećala je brzinu i uspješnost u detektiranju prisutnosti mikroorganizama u hemokulturama budući da se bočice za hemokulturu okreću tako da se sadržaj bočica neprestano miješa, a rast bakterija se prati i

očitava svakih 10 minuta. Bakterijski rast se detektira tako što se na dnu bočice za hemokulturu nalazi senzor koji je od medija odvojen membranom koja je selektivno propusna za ugljikov dioksid. Budući da mikroorganizmi aktivnim metabolizmom proizvode CO_2, on prolazi preko membrane i dovodi do zakiseljavanja senzora što uzrokuje promjenu boje koju uređaj detektira kolorimetrijski ili fluorometrijski, ovisno o sustavu (14). Dostupna su tri sustava za kontinuirano praćenje hemokultura odobrena od američke Uprave za hranu i lijekove (FDA), uključujući BACTEC (Becton-Dickinson, Sparks, MD, SAD), BacT/Alert (bioMérieux, Inc., Durham, Sjeverna Karolina) i VersaTREK (Thermo Scientific, Waltham , Massachusetts). Sva tri sustava otkrivaju rast bakterija i gljiva pomoću nekog oblika detekcije plina, ali metode koje koriste su različite. BacT/Alert detektira mikroorganizme u uzorku na temelju kolorimetrijske promjene koja je nastala kao posljedica pada pH zbog povećane razine ugljikovog dioksida. Bitne značajke BacT/Alert sustava navedene su u Tablici 1 (9).

Tablica 1. Osnovne značajke BacT/Alert sustava za kontinuirano praćenje hemokultura

Sustav za kontinuirano praćenje hemokultura	Tip bočice	Uzorak	Dodatne informacije	Maksimalni volumen
BacT/ALERT	BacT/ALERT FA PLUS	Krv ili SBF *(*engl. *simulated body fluid)*	Aerobni medij s polimernom smolom	10 mL
	BacT/ALERT FN PLUS	Krv ili SBF	Anaerobni medij s polimernom smolom	10 mL
	BacT/ALERT PF PLUS	Krv	Pedijatrijska, standardna aerobna	4 mL
	BacT/ALERT SA	Krv ili SBF	Standardna aerobna	10 mL
	BacT/ALERT SN	Krv ili SBF	Standardna anaerobna	10 mL
	BacT/ALERT BPA	Trombociti	Aerobni medij	10 mL
	BacT/ALERT BPN	Trombociti	Anaerobni medij	10 mL

VersaTREK sustav detektira prisutnost mikroorganizma u uzorku tako što mjeri promjene tlaka uzrokovane potrošnjom ili proizvodnjom plina, odnosno prati proizvodnju ugljikovog dioksida (CO_2), vodika (H_2) i dušika (N_2), a potrošnju kisika (O_2). Značajke VersaTREK sustava navedene su u Tablici 2 (9).

Tablica 2. Osnovne značajke VersaTREK sustava za kontinuirano praćenje hemokultura

Sustav za kontinuirano praćenje hemokultura	Tip bočice	Uzorak	Dodatne informacije	Maksimalni volumen
VersaTREK	REDOX 1	Krv, SBF	Aerobna	10 mL
	REDOX 2	Krv, SBF	Anaerobna	10 mL
	REDOX 1 EZ Draw	Krv, SBF	Aerobna, direktna inokulacija krvi	5 mL
	REDOX 2 EZ Draw	Krv, SBF	Anaerobna, direktna inokulacija krvi	5 mL
	VersaTREK Myco	Krv, SBF ili kultivirani uzorak	Medij za mikobakterije	1 mL

BACTEC sustav za kontinuirano praćenje hemokultura detektira prisutnost mikroorganizma u uzorku tako što prati promjenu fluorescencije koja nastaje kao posljedica pada pH zbog povećanih razina ugljikovog dioksida (9). Ako su u bočicama za hemokulturu prisutni mikroorganizmi, oni svojim aktivnim metabolizmom stvaraju CO_2 koji reagira s bojom u senzoru na dnu bočice te se tako mijenja količina svjetlosti koju fluoroscentni materijal u senzoru apsorbira. Svjetleća dioda osvjetljava senzor svakih 10 minuta, a fotodetektor u svakom utoru mjeri razinu fluorescencije i hvata reflektiranu svjetlost. Kad sustav otkrije pozitivnu hemokulturu odmah se pali lampica pokazivača na prednjem dijelu instrumenta i zvučni alarm (15). Osnovne značajke BACTEC sustava prikazane su u Tablici 3 (9).

Tablica 3. Značajke BACTEC sustava za kontinuirano praćenje hemokultura

Sustav za kontinuirano praćenje hemokultura	Tip bočice	Uzorak	Dodatne informacije	Maksimalni volumen
BACTEC	BACTEC Plus Aerobic	Krv	Aerobni medij s polimernom smolom	10 mL
	BACTEC Plus Anaerobic	Krv	Anaerobni medij s polimernom smolom	10 mL
	BACTEC Peds Plus	Krv	Pedijatrijska, aerobni medij s polimernom smolom	5 mL
	BACTEC Lytic Anaerobic	Krv	Anaerobni medij s agensom za lizu crvenih krvnih stanica i bijelih krvnik stanica	10 mL
	BACTEC Standard Aerobic	Krv	Standardna aerobna	7 mL
	BACTEC Standard Anaerobic	Krv	Standardna anaerobna	7 mL
	BACTEC Myco/F Lytic	Krv	Medij za gljive i mikobakterije	5 mL

U sustavu za kontinuirano praćenje hemokultura rutinska inkubacija traje 4 do 7 dana, a utvrđeno je da se 98 % do 99 % patogena u hemokulturama otkrije unutar pet dana inkubacije tako da je inkubacija u trajanju od 5 dana optimalna i njezinom primjenom bi se smanjilo nepotrebno zauzimanje prostora u inkubatoru. U iznimnim slučajevima, kada se sumnja da je uzročnik spororastući ili zahtijevan mikroorganizam, duljina inkubacije hemokultura može se opravdano produljiti (9).

Daljni analitički korak u obradi hemokulture koju je uređaj prepoznao kao pozitivnu je bojenje preparata po Gramu. U slučaju da se pozitivna hemokultura nije obojila Gram bojenjem, mogu se koristiti alternativna bojenja kao što je akridin oranž. Nakon Gram bojenja, prema mikroskopskom nalazu određuju se daljnji direktni testovi. poput MALDI-TOF identifikacije uzročnika (9).

MALDI-TOF masena spetrometrija koristi se za brzu identifikaciju bakterija i kvasnica poraslih u pozitivnim hemokulturama (9). Osim na pozitivnim hemokulturama, metoda se često koristi za identifikaciju uzročnika iz supkultura koje su inkubirane nekoliko sati na krutoj podlozi. Točnost identifikacije uzročnika ovom metodom ima stopu od 80 %, a obično je bolja kod identifikacije gram negativnih bakterija nego kod gram pozitivnih (9, 14). Prednosti MALDI-TOF metode su mogućnost obrade većeg broja hemokultura istovremeno te neograničen panel mikroorganizama koje može prepoznati (14).

2. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja jesu:

Ispitati utjecaj različitih

1) volumena krvi na vrijeme detekcije pozitiviteta različitih uzoraka krvi
2) Ispitati korelaciju volumena krvi, vremena do detekcije pozitiviteta i izoliranog uzročnika
3) Ispitati odnos inokuluma, volumena i vremena do detekcije pozitiviteta

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao presječna studija u kojem su podatci prikupljeni pregledom podataka pacijenata i rezultata mikrobioloških analiza njihovih uzoraka na Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije, Klinički bolnički centar Osijek, analizirani, prikazani i interpretirani u skladu s ciljevima istraživanja.

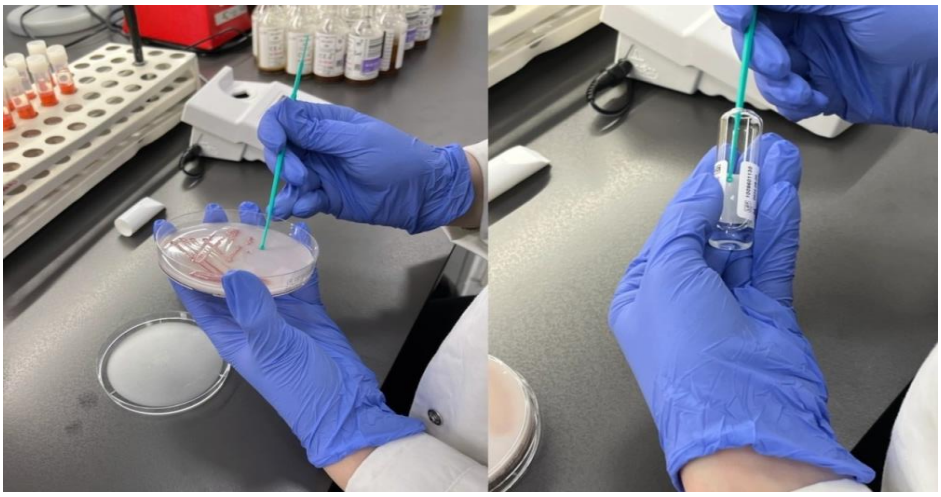
3.2. Ispitanici

U istraživanju su se za ispitivanje utjecaja volumena krvi na detekciju pozitiviteta te za ispitivanje korelacije volumena krvi, vremena do detekcije pozitiviteta i izoliranog uzročnika koristili obrađeni uzorci hemokultura pacijenata zaprimljenih u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Kliničkog bolničkog centra Osijek u periodu od 1. veljače 2023. do 31.ožujka 2023. godine. Nadalje, za ispitivanje utjecaja inokuluma i volumena inokuliranog uzorka na vrijeme detekcije pozitiviteta korištene su sterilne aerobne, anaerobne i pedijatrijske bočice za hemokulturu inokulirane bakterijom *E.coli*.

3.3. Metode

U istraživanju su korišteni podatci o izoliranim bakterijama, masi bočice i vremenu detekcije pozitiviteta bočica u aparatu za kontinuirano praćenje hemokultura. Vaganjem bočice je procijenjen inokulirani volumen krvi prema formuli $V = (m - \Delta m)/g$, odnosno volumen je jednak razlici mase bočice i prosječne mase prazne bočice podijeljene s gustoćom krvi 1,055 g/mL (16). Prosječna masa negativne bočice određena je vaganjem 50 aerobnih, 50 anaerobnih i 50 pedijatrijskih sterilnih bočica za hemokulturu i određivanjem srednje vrijednosti njihovih masa.

Osim bilježenja volumena, vremena i izoliranih mikroorganizama detektiranih u uzorcima hemokultura bolesnika pristiglih u laboratorij na rutinsku obradu uzoraka hospitaliziranih bolesnika, ispitan je i utjecaj inokuluma i volumena inokuliranog uzorka tako što je najprije u 5 ml fiziološke otopine napravljena suspenzija bakterija optičke gustoće 0,5 McFarland standarda koja korelira koncentraciji bakterija od 0,5 x 10^8 CFU/mL. Slika 1 prikazuje proces pripreme suspenzije bakterija optičke gustoće 0,5 McFarlanda.

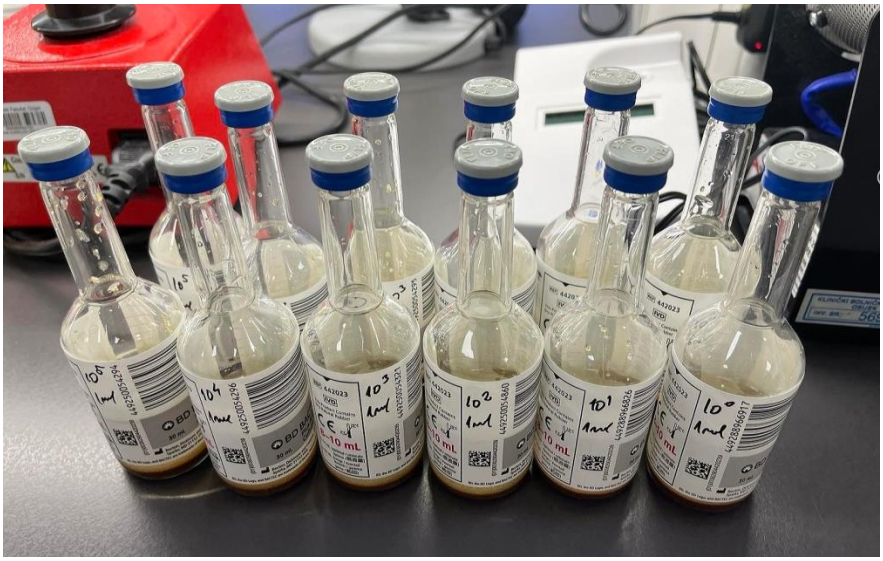


Slika 1: Prvi korak u procesu pripreme suspenzije bakterija jest lagano uzimanje kolonije bakterija prethodno nasađenih na hranjivi agar. Zatim se kolonija bakterija nanese na unutrašnju stijenku bočice te se postepeno miješa s fiziološkom otopinom. Optičku gustoću provjeravamo u densitometru, a proces ponavljamo dok ne dobijemo optičku gustoću od interesa (u našem slučaju 0,5 McFarland). *Izvor: Autorica rada*

Dalje, s pripremljenom suspenzijom bakterija (*E.coli* ATCC 25922) u nizu epruveta s po 9 mL fiziološke otopine napravljena su serijska razrjeđenja, a proces je prikazan na slici 2.

Slika 2: Iz pripremljene suspenzije koncentracije 0,5 x 10^8 CFU/mL 1 mL tekućine pipetom prenesemo u iduću epruvetu za koju vrijedi da je inokulum 10^7 CFU/mL. Epruvetu inokuluma 10^7 CFU/ mL promiješamo na električnoj miješalici (vorteksu) te iz nje dalje pipetiramo 1 mL u iduću epruvetu i tako radimo razrijeđenja sve do epruvete inokuluma 10^0 CFU/mL. *Izvor: Autorica rada*

U bočice za hemokulturu inokuliran je po 1 mL ili 6 mL tako pripremljene suspenzije bakterija različitih inokuluma. Sve bočice, kao i sve epruvete suspenzije, su označene tako da se osigura inokulacija suspenzije odgovarajuće koncentracije bakterija u odgovarajuću bočicu za hemokulturu (prikazano na slici 3). Proces inokulacije pripremljene suspenzije u bočice za hemokulturu prikazan je na slikama 4 i 5.



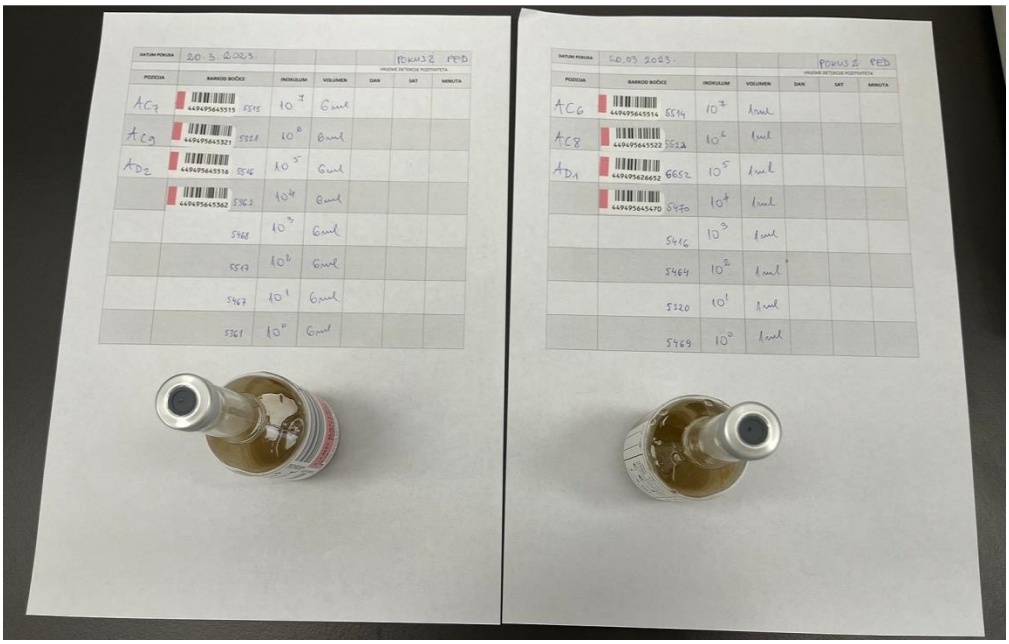
Slika 3: Sterilne aerobne bočice za hemokulturu označene odgovarajućim volumenom i koncentracijom suspenzije bakterija. *Izvor: Autorica rada*

Slika 4: Sa sterilnih bočica za hemokulturu najprije skidamo čep te ih dezinficiramo 70%-tnim etanolom. Potrebno je sačekati 1 minutu da se alkohol u potpunosti osuši prije nego se krene s inokulacijom. *Izvor: Autorica rada*

Slika 5: Pripremiti sterilne igle i šprice od 1 mL i 10 mL kojima inokuliramo 1 mL, odnosno 6 mL bakterijske suspenzije u sterilne bočice za hemokulturu. Prije inokulacije potrebno je suspenzije opet dobro promiješati na vorteksu kako bi se postigla bolja homogenizacija. Nakon što je u špricu uzet odgovarajući volumen suspenzije bakterija, potrebno je pažljivo izbaciti mjehuriće zraka te se tada može inokulirati u bočicu za hemokulturu. *Izvor: Autorica rada*

Nakon inokulacije suspenzije bakterija bočice su uložene u sustav za kontinuirano praćenje hemokultura (prikazano na slici 6). Prilikom ulaganja bočica u sustav, radi kontinuiteta praćenja i bolje evidencije, bilježeni su barkodovi bočica, njihova obilježja kao i njihove pozicije u sustavu za kontinuirano praćenje hemokultura te vrijeme do detekcije pozitiviteta, što je prikazano na slici 7.

Slika 6: Prilikom ubacivanja inokuliranih bočica za hemokulturu skenira se barkod bočice, zatim se upišu podatci te se odabere pozicija u sustavu za kontinuirano praćenje hemokultura u koju ćemo staviti uzorak. *Izvor: Autorica rada*



Slika 7: Način bilježenja obilježja bočica i njihovih pozicija u sustavu za kontinuirano praćenje hemokultura. *Izvor: Autorica rada*

Po detekciji pozitiviteta sadržaj bujona je inokuliran na krvni agar kako bi se provjerio proces rada. Pokus je ponavljan u triplikatu.

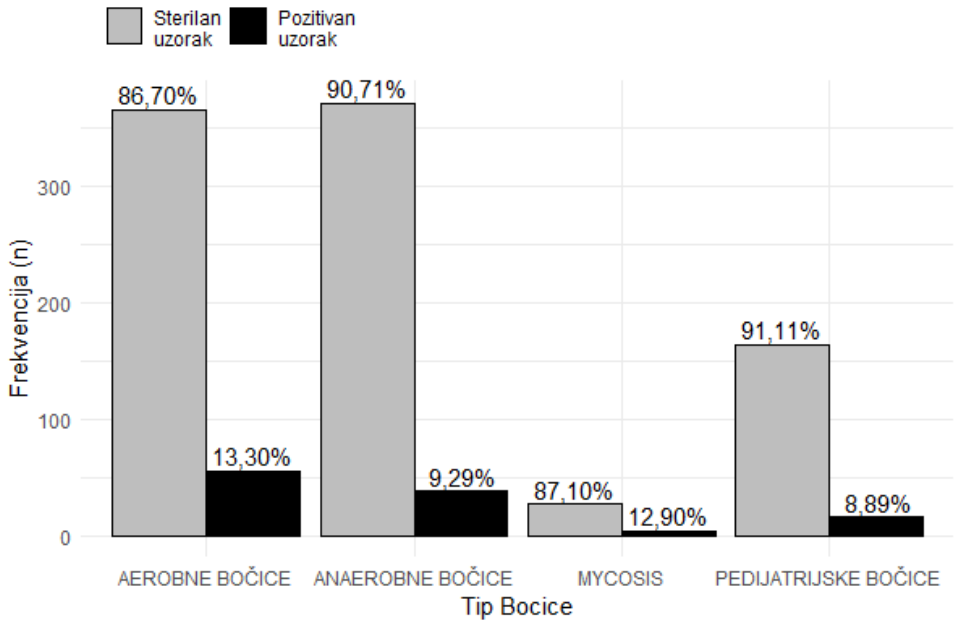
3.4. Statističke metode

Za nominalne varijable u istraživanju navedene su frekvencije pojavljivanja. Pomoću Shapiro - Wilkovog testa analizirat će se normalna distribuiranost varijabli. Ukoliko raspodjela kontinuiranih varijabli ne odstupa od normalne, koristit će se aritmetička sredina i standardna devijacija za prikaz srednje vrijednosti i mjere raspršenja, a za usporedbu tih varijabli koristit će se parametrijski testovi. Ukoliko raspodjela kontinuiranih varijabli nije normalno distribuirana, za prikaz srednje vrijednosti i mjere raspršenja koristit će se medijan i raspon rezultata, a za njihovu usporedbu neparametrijski testovi. Za statističku analizu i grafički prikaz podataka bit će rabljen programski sustav R (RStudio Team (2021). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL http://www.rstudio.com/) i Microsoft Excel for Microsoft 365 MSO (Version 2111. Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD).

4. REZULTATI

U ispitivanom periodu od 1. veljače 2023. do 31. ožujka 2023. je ukupno prikupljen 1041 uzorak krvi bolesnika pristigao u laboratorij na rutinsku analizu u ranije navedenom vremenskom periodu i 144 uzorka iz eksperimentalnog dijela istraživanja u kojem su u bočice inokulirani različiti volumeni različitih inokuluma suspenzije E.coli ATCC 29522.

Istraživanje je provedeno na 238 pozitivnih uzoraka (102 uzoka iz krvi te 136 uzoraka dobivenih u eksperimentalnom dijelu s E.coli ATCC 25922. Zastupljenost uzoraka pacijenata prema pozitivitetu i tipu bočice prikazan je na Slici 8.



Slika 8. Zastupljenost uzoraka prema tipu bočice i pozitivitetu uzorka

Tablica 4 prikazuje strukturu uzorka obzirom na rod izolata te tip bočice. Analizom nisu obuhvaćeni uzorci koji su imali negativan volumen te uzorci u Mycosis bočicama, sveukupno 173 uzorka. Iz daljnje obrade pozitivnih uzoraka izdvojeno je šest uzoraka čiji su volumeni bili manji od 0,01 ml. Iz krvi bolesnika detektirano je osamnaest različitih vrsta izolata.

Tablica 4. Struktura uzorka obzirom na rod izolata i tip bočice (N – broj sudionika, $\chi 2$ – Hi kvadrat test, Df – broj stupnjeva slobode)

	N	**%**	**χ2**	**Df**	**P**
Izolat			168,98	9	< 0,01
Acinetobacter spp.	1	0,98 %			
Candida spp.	12	11,76 %			
Corynebacterium spp.	7	6,86 %			
Enterobacter spp.	5	4,90 %			
Enterococcus spp.	8	7,84 %			
Escherichia spp.	12	11,76 %			
Klebsiella spp.	5	4,90 %			
Listeria monocytogenes	2	1,96 %			
Pseudomonas spp.	2	1,96 %			
Staphylococcus spp.	48	47,06 %			
Ukupno	**102**	100,00%			
Tip bočice			32,88	2	< 0,01
Aerobne Bočice	56	54,90 %			
Anaerobne Bočice	37	36,27 %			
Pedijatrijske Bočice	9	8,82 %			
Ukupno	**102**	100,00%			

Za izračun inokuliranog volumena uzorka nalaza iz krvi koristila se formula koja uključuje masu uzorka, masu prazne bočice te gustoću krvi. Kako bismo dobili masu prazne bočice izvagano je 50 anaerobnih bočica, 50 pedijatrijskih bočica i 50 aerobnih bočica. Srednja vrijednost mase sterilnih bočica, standardna devijacija kao i rezultat t testa kojim je ispitana razlike između prosječne mase praznih bočica su prikazani u sljedećoj tablici.

Tablica 5. Masa (g) praznih bočica

Tip bočice	Ar. sredina (stand. devijacija)	**P**
		< 0,01
Aerobne bočice	59,57 (0,19)	
Anaerobne bočice	64,97 (0,13)	
Pedijatrijske bočice	68,77 (0,22)	

Podatci o prosječnoj masi bočica dobiveni vaganjem 1041 uzorka krvi bolesnika, raspon masa te rezultat Kruskal-Wallis testa kojim su ispitane razlike između masa obzirom na tip bočice prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Masa svih vaganih bočica

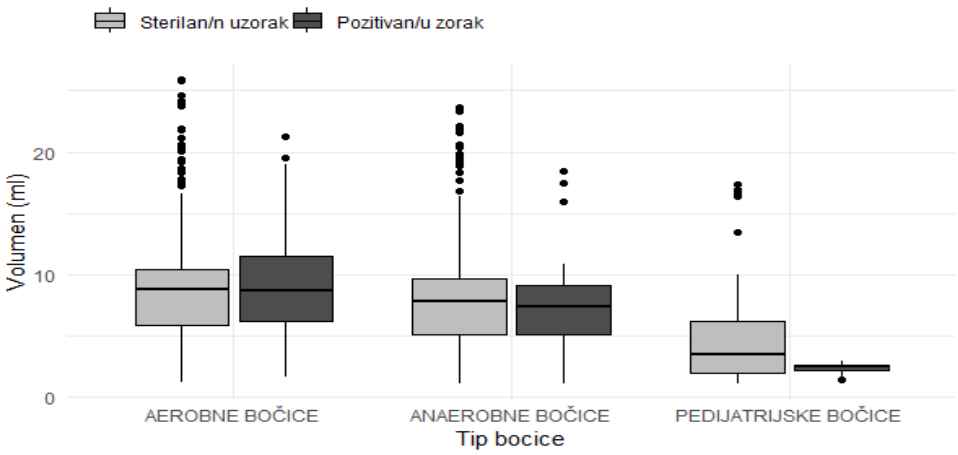
Tip bočice	Masa (g)	P
		< 0,01
Aerobne bočice	(60,76 – 86,87) 68,75	
Anaerobne bočice	(66,03 – 89,91) 73	
Pedijatrijske bočice	(69,93 – 87,08) 71,96	

Nadalje, za uzorke iz krvi bolesnika su izračunati parametri za volumen i masu uzoraka s obzirom na tip bočice te pozitivitet uzorka. U sljedećoj tablici su prikazani rezultati.

Tablica 7. Vrijednosti mase i volumena uzorka obzirom na tip bočice i pozitivitet uzorka

Tip bočice	Pozitivitet	Frekv.	P	Masa (g)	p	Volumen (ml)	p
			< 0,01		< 0,01		< 0,01
Aerobne bočice	Pozitivno	56		(61,31 – 81,96) 68,74		(1,64 – 21,22) 8,69	
Aerobne bočice	Sterilno	359		(60,76 – 86,87) 68,78		(1,12 – 25,87) 8,73	
Anaerobne bočice	Pozitivno	37		(66,11 – 84,41) 72,68		(1,08 - 18.43) 7.31	
Anaerobne bočice	Sterilno	358		(66.03 - 89.91) 73.21		(1,01 – 23,64) 7,81	
Pedijatrijske bočice	Pozitivno	8		(70,19 – 71,77) 71,36		(1,35 – 2,85) 2,46	
Pedijatrijske bočice	Sterilno	50		(69,93 – 87,08) 72,43		(1,10 – 17,36) 3,47	
Ukupno		**868**					

* Razlike između frekvencija navedenih u tablici ispitane su Hi-kvadrat testom ($\chi 2$ = 957,67, df = 5), a razlike između mase, odnosno volumena uzorka, ispitane su Kruskal-Wallis testom



Slika 9. Volumen uzoraka obzirom na tip bočice i pozitivitet uzorka

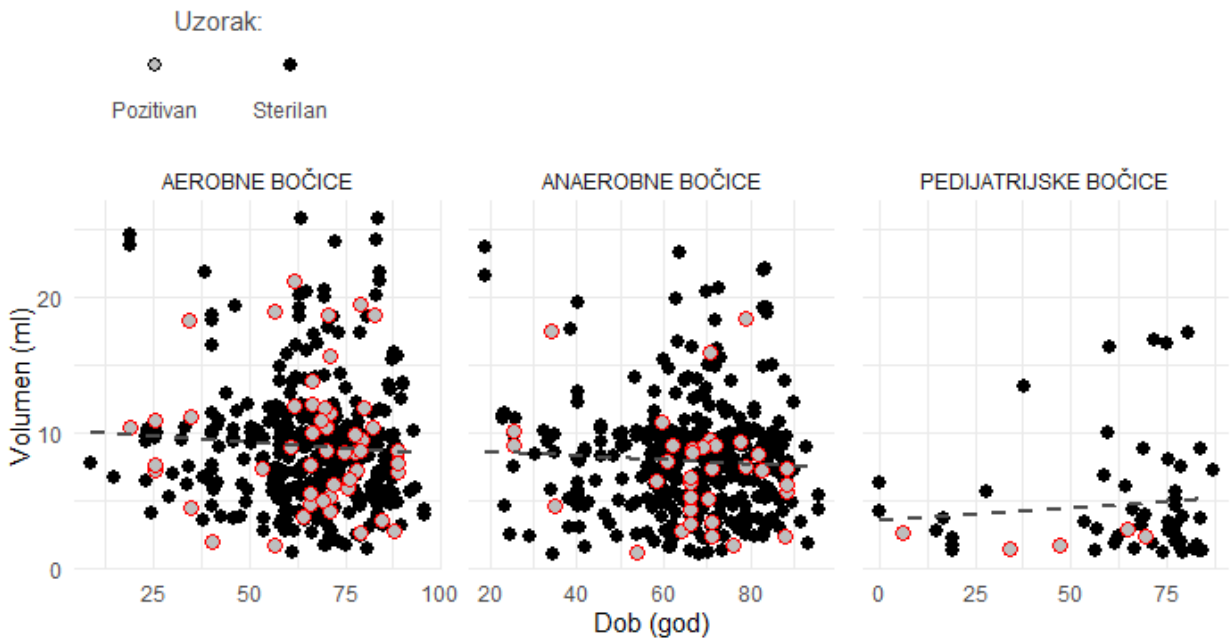
Kod uzoraka krvi se bilježila i dob ispitanika. Prosječna dob ispitanika bila 59g 1mj, najmlađi ispitanik je bio u dobi od svega nekoliko sati, a najstariji je imao 95g i 10mj.

Tablica 8. Struktura uzorka obzirom na dob; Vrijednosti volumena obzirom na dobnu kategoriju

Dob (god)	**Frekvencija**	**p**	**Volumen (ml)**	**p**
		< 0,01		> 0,05
0 – 1	2		(4,14 – 6,26) 5,2	
1 - 18	7		(2,6 – 7,8) 2,75	
			(1,26 – 24,63)	
18 - 30	31		9,53	
			(1,01 – 21,88)	
30 - 50	86		7,99	
			(1,08 – 18,99)	
50 - 60	116		8,05	
			(1.07 - 25.87)	
60 - 70	257		8.19	
			(1,1 – 24,07)	
70 - 80	218		8.18	
			(1,29 – 25,78)	
80 - 90	139		7,44	
			(1,82 – 13,67)	
90 - 100	12		5,5	
Total	**868**			

* Razlike između frekvencija ispitane su Hi-kvadrat testom (($\chi 2$ = 738,15, df = 5), a razlike volumena krvi obzirom na dob ispitanika ispitane su Kruskal-Wallis testom

Najmanji volumen kod ispitanika je bio kod ispitanika u dobi od jedne do osamnaest godina. Odnos volumena krvi i dobi je prikazan na sljedećem grafu:



Slika 10. Odnos dobi ispitanika i volumena uzorka

Dvije numeričke varijable koju su bile predmet istraživanja su volumen krvi (mjereno u ml) te vrijeme detekcije pozitiviteta (mjereno u minutama). Karakteristike tih varijabli za uzorke iz krvi bolesnika su prikazane u Tablici 9.

Tablica 9. Osnovni deskriptivni parametri ispitivanih varijabli

	N	M	SD	min	Max	A	S	S-W	p
Volumen krvi (ml)									
	102	8,06	4,78	1,03	21,22	0,88	3,52	0,93	< 0,01
Vrijeme detekcije pozitiviteta (min)									
	102	1506,55	1270,03	218,00	7125,00	2,43	9,61	0,72	< 0,01

* M – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, Min – minimalni postignuti rezultat, Max –maksimalni postignuti rezultat, A-asimetričnost, S-zakrivljenost, S-W – Shapiro-Wilkov test za testiranje normalnosti distribucije

Osnovni deskriptivni parametri uzoraka dobivenih eksperimentom prikazani u Tablici 10.

Tablica 10. Osnovni deskriptivni parametri ispitivanih varijabli

	N	M	SD	min	Max	A	S	S-W	p
Volumen (ml)									
	136	3,54	2,51	1,00	6,00	-0,03	1,00	0,64	< 0,01
Vrijeme detekcije pozitiviteta (min)									
	136	464,74	151,34	180,00	829,00	0,19	2,24	0,98	0,06
Inokulum (CFU/ml)									
	136	1470588,16	3359964,95	1,00	10000000,00	2,13	5,60	0,46	< 0,01

* M – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, Min – minimalni postignuti rezultat, Max –maksimalni postignuti rezultat, A-asimetričnost, S-zakrivljenost, S-W – Shapiro-Wilkov test za testiranje normalnosti distribucije

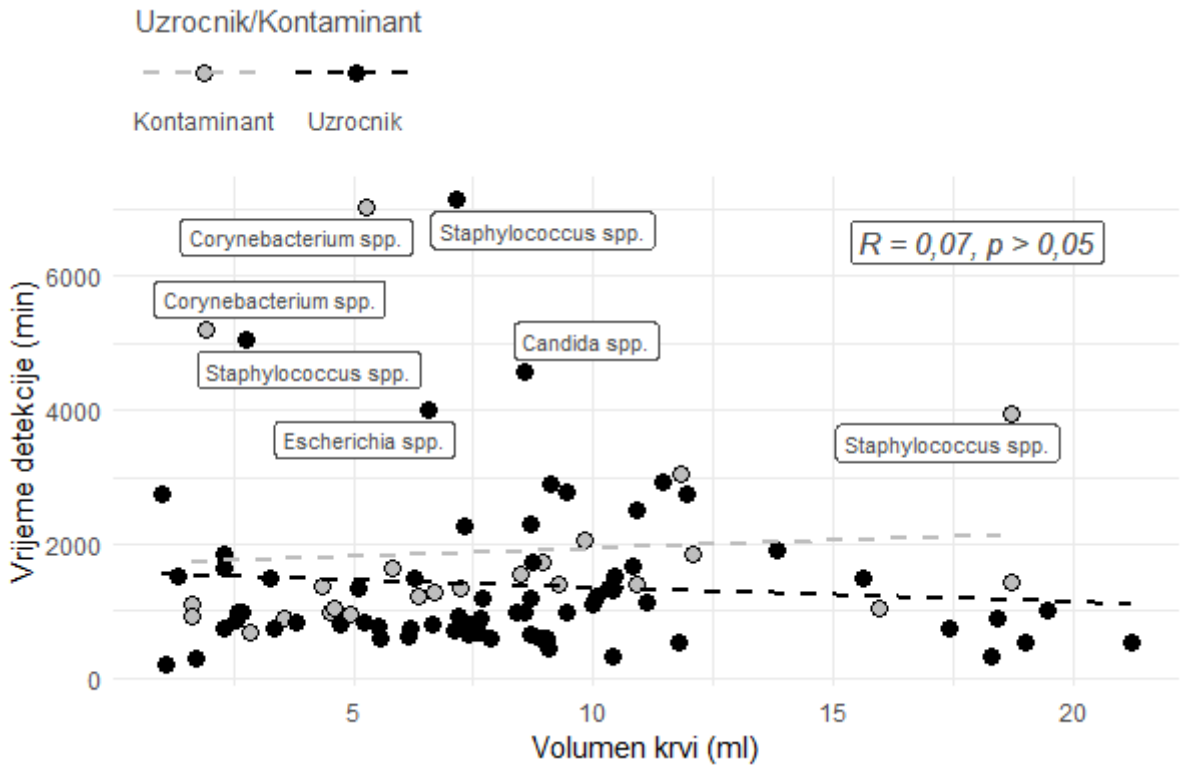
Nadalje, u Tablici 11 prikazane su numeričke vrijednosti vremena detekcija i volumena uzorka obzirom na tip izolata za uzorke uzete iz krvi bolesnika. Uz to, prikazane su i razlike između navedenih frekvencija. Razlike između frekvencija su ispitane Hi-kvadrat testom ($\chi 2$ = 738,15, Df = 5), dok su razlike između volumena, odnosno vremena detekcije obzirom na izolat ispitane Kruskal-Wallis testom.

Tablica 11. Numeričke vrijednosti volumena i vremena detekcije pozitiviteta obzirom na tip izolata

Izolat	Frekv.	p	Volumen (ml)	p	Vrijeme detekcije (min)	P
		< 0,01		> 0,05		< 0,01
Candida spp.	12		(2,31 – 15,63) 10,45		(974 - 4577) 2382	
Corynebacterium spp.	7		(1,94 – 18,72) 11 84		(1033 - 7022) 1851	
Pseudomonas spp.	2		(8,69 – 18,99) 13,84		(547 - 2305) 1426	
Staphylococcus spp.	48		(1,03 – 18,7) 6,67		(316 - 7125) 1203,5	
Enterococcus spp.	8		(2,54 – 19,48) 6,33		(444 - 1029) 840	
Escherichia spp.	12		(1,08 – 21,22) 7,53		(218 - 4006) 750,5	
Enterobacter spp.	5		(5,57 – 8,71) 7,1		(584 - 725) 643	
Klebsiella spp.	5		(6,17 – 10,4) 9,04		(314 - 754) 596	
Listeria monocytogenes	2		(7,84 – 8,92) 8,38		(588 - 592) 590	
Acinetobacter spp.	1		(11,77 – 11,77) 11,77		(533 - 533) 533	
Ukupno	**102**					

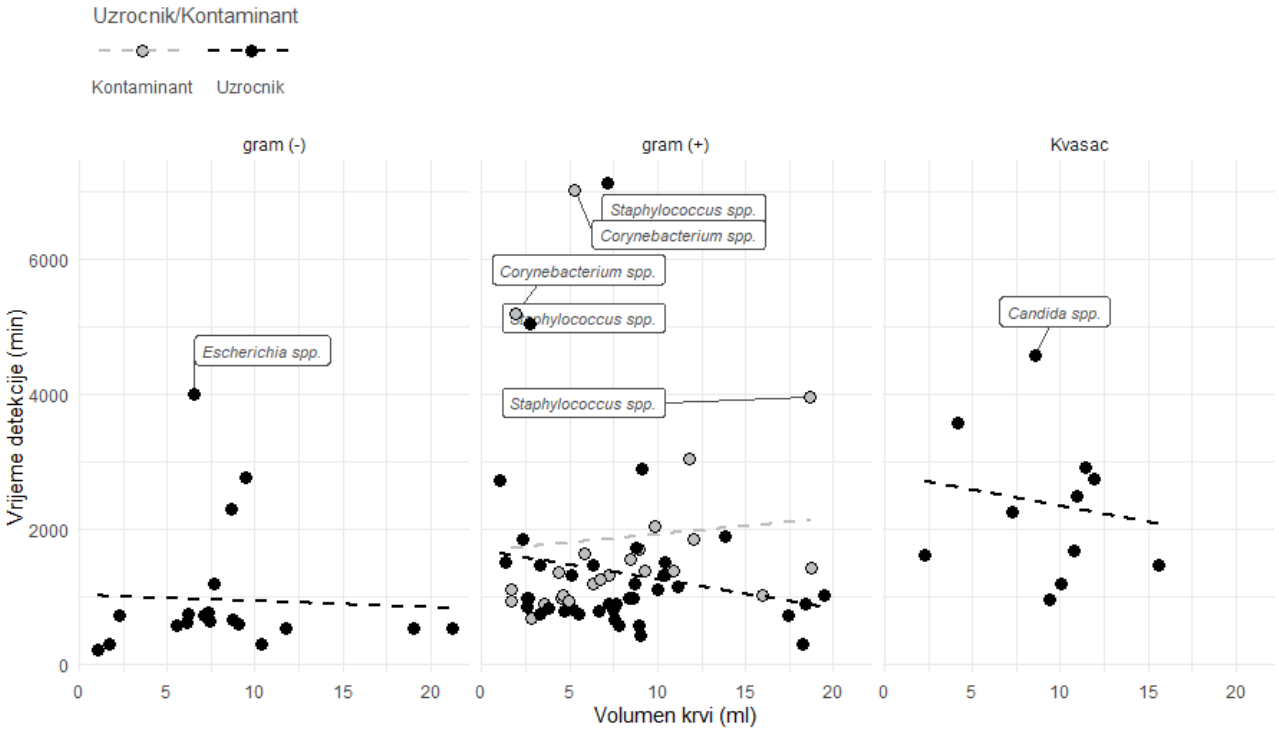
Više od 50 % uzoraka izolata *Candida spp.* je trebalo barem 2382 minuta (približno 1 dan i 15 sati) za detekciju pozitiviteta. Nešto manje vrijeme detekcije pozitiviteta je imao izolat *Corynebacterium spp.*. Kod ovog izolata je 50 % uzoraka imalo vrijeme detekcije iznad 1851 minute (približno 1 dan i 6 sati). Najnižu medijan vrijednost vremena potrebnog za detekciju pozitiviteta imao je izolat *Acinetobacter spp.,* ali je izolat zabilježen tek jednom tokom istraživanja.

Cilj je bio ispitati korelaciju između volumena krvi te vremena detekcije pozitiviteta različitih izolata. Budući da distribucija obje ispitivane varijable uvelike odstupa od normalne (Tablica 5), korelacija volumena krvi i vremena potrebnog za detekciju pozitiviteta ispitana je Spearmanovim koeficijentom korelacije. Koeficijent korelacije je bio pozitivan (0,07) ali ne i statistički značajan. Stoga možemo zaključiti kako volumen krvi i vrijeme za detekciju pozitiviteta međusobno ne koreliraju. Rezultati te trend su prikazani na sljedećoj Slici 11.



Slika 11. Volumen krvi i vrijeme detekcije pozitiviteta

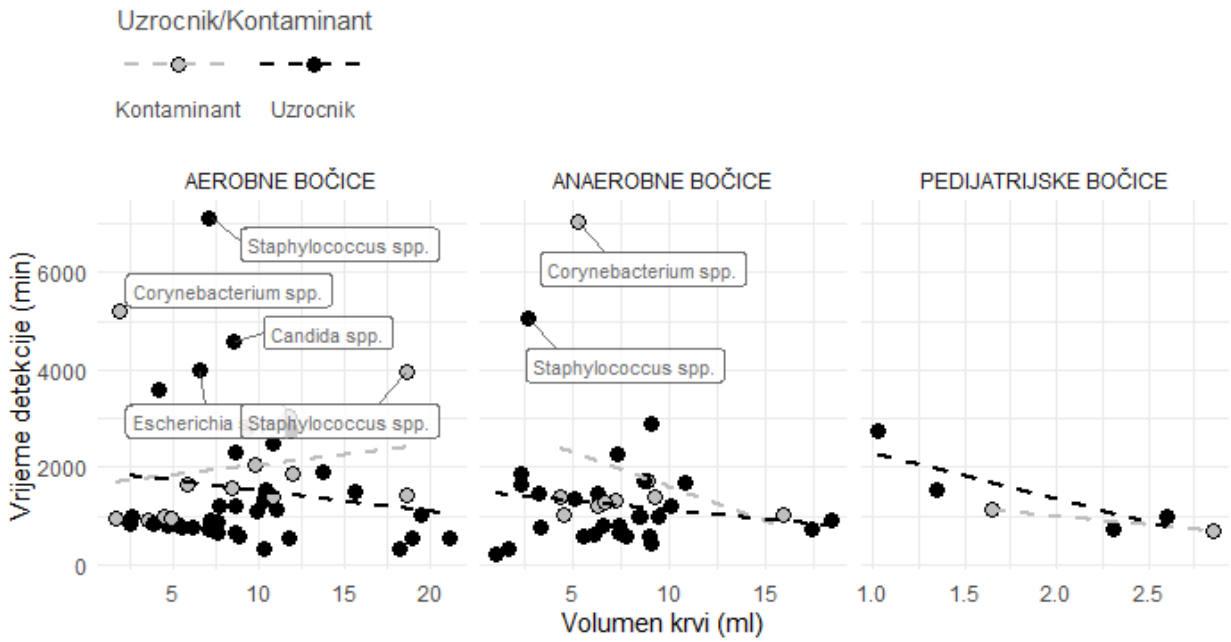
Na prethodnom grafu je dodatno naglašeno koji uzorak je uzročnik, a koji kontaminant. Uz to su posebno ispitani koeficijenti korelacije za uzročnike, a posebno za kontaminante. Koeficijent korelacije za uzročnike bio je gotovo 0 te nije bio statistički značajan, dok je koeficijent korelacije za kontaminante bio 0,49 te je bio statistički značajan na razini značajnosti manjoj od 5 %. Također, dodatno je ispitana i korelacija obzirom na gram-pozitivne, gram-negativne bakterije te kvasac. Grafički prikaz je dan na Slici 12.



Slika 12. Odnos volumena krvi i vremena potrebnog za detekciju pozitiviteta obzirom na gram-pozitivne, gram-negativne bakterije te kvasac

Korelacija između volumena krvi i vremena potrebnog za detekciju pozitiviteta kod gram-negativnih bakterija iznosila je -0,11 i nije bila statistički značajna. Korelacija između volumena krvi i vremena potrebnog za detekciju pozitiviteta kod gram-pozitivnih bakterija iznosila je 0,07 i nije bila statistički značajna. Konačno, korelacija za kvasac iznosila je -0,02 te ni ona nije bila statistički značajna.

Nadalje, zanimala nas je i korelacija između vremena detekcije pozitiviteta i volumena krvi, ali ovaj put obzirom na tip bočice. Analiza je provedena za aerobni tip bočice, anaerobni tip bočice te pedijatrijski tip bočice. Tako je za aeorbni tip bočice korelacija između volumena i vremena detekcije bila pozitivna i iznosila je 0,06, ali nije bila statistički značajna. Kod anaerobnog tipa bočice korelacija između vremena detekcije pozitiviteta te volumena iznosila je -0,07, ali nije bila statistički značajna. Za pedijatrijski tip bočice korelacija je iznosila -0,74 te je bila značajna na razini značajnosti manjoj od 5 %. To jest, kod uzoraka u pedijatrijskim bočicama gdje je uzeta veća količina krvi bilo je potrebno manje vremena za detekciju pozitiviteta. Grafički prikaz opisanog je dan na Slici 13.



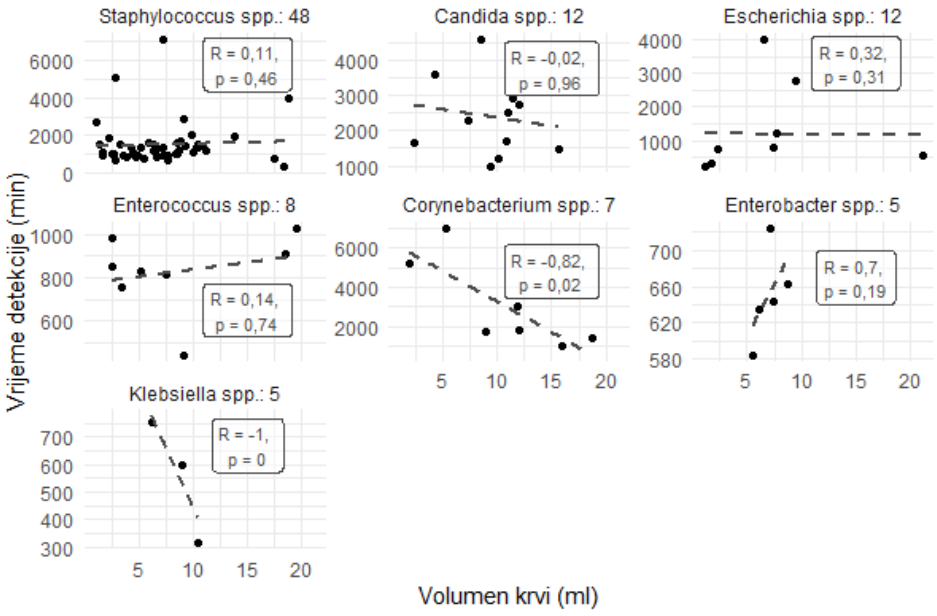
Slika 13. Odnos volumena i vremena potrebnog za detekciju obzirom na tip korištene bočice

U drugom cilju, slično kao i prvom, htjelo se ispitati korelaciju između vremena potrebnog za detekciju pozitiviteta te volumena krvi, no ovaj put obzirom na izoliranog uzročnika. Za potrebe testiranja promatrane su samo grupe izolata sa pet ili više uzoraka. Uvjet nisu zadovoljili *Listeria monocytogenes* (2 izolirana uzročnika), *Acinetobacter spp.* (1 izolirani uzročnik) te *Pseudomonas spp*. (2 izolirana uzročnika). Uzimajući u obzir prethodno navedeno imali smo sljedeće izolate:

Tablica 12. Grupe izoliranih uzročnika (N – broj sudionika, $\chi 2$ – Hi kvadrat test, Df – broj stupnjeva slobode))

	N	**%**	**$\chi 2$**	**Df**	**p**
Izolat			116,04	7	< 0,01
Staphylococcus spp.	48	47,06 %			
Candida spp.	12	11,76 %			
Escherichia spp.	12	11,76 %			
Enterococcus spp.	8	7,84 %			
Corynebacterium spp.	7	6,86 %			
Enterobacter spp.	5	4,90 %			
Klebsiella spp.	5	4,90 %			
Ostali	5	4,90 %			
Ukupno	**102**				

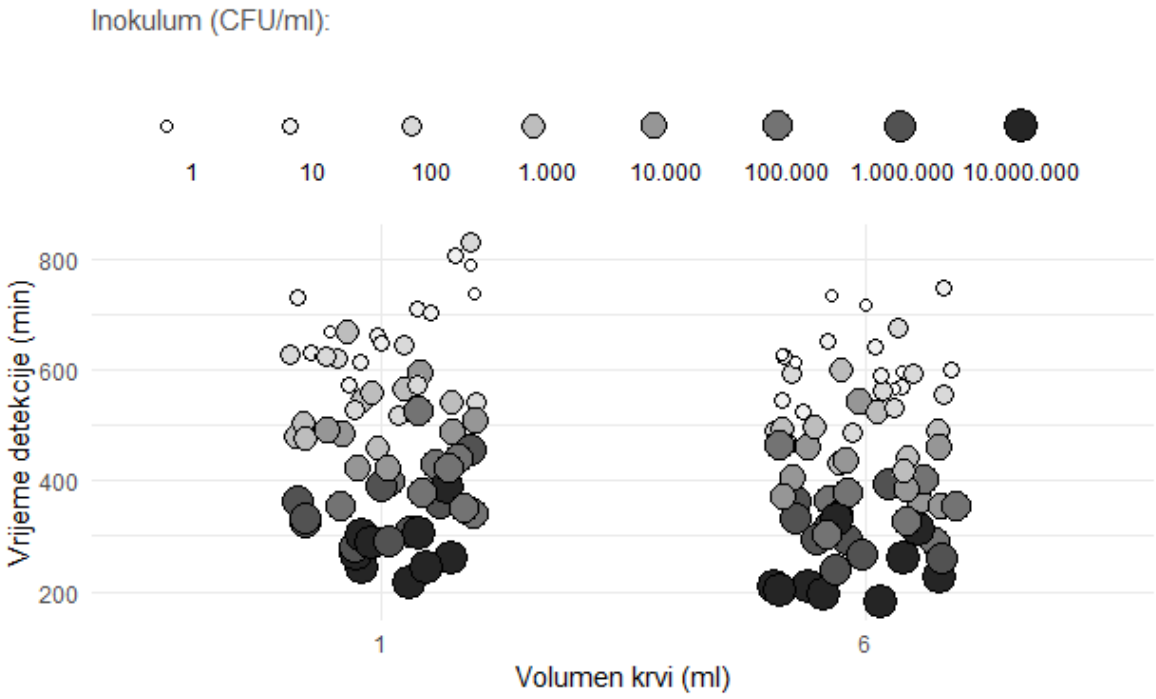
Za testiranje korelacije između vremena detekcije i volumena krvi kod različitih uzročnika korišten je Spearmanov koeficijent korelacije. Rezultati su skupno prikazani na sljedećem grafu:



Slika 14. Odnos volumena i vremena detekcije pozitiviteta po tipu izoliranog uzročnika

Kod izolata *Corynebacterium spp.* je dobivena izrazito negativna korelacija vrijednosti -0,82 te je ista bila statistički značajna na razini značajnosti manjoj od 5 %. Od ostalih rezultata može se istaknuti izrazito negativan koeficijent korelacije kod *Klebsiella spp.* izolata, ali je u uzorku bilo svega 5 izoliranih bakterija tog tipa.

U trećem cilju ispitana je korelacija između inokuluma, volumena krvi i vremena detekcije pozitiviteta. Od 144 uzorka dobivena u eksperimentalnom dijelu istraživanja korelacija na navedenim varijablama ispitana je za 136 pozitivnih uzoraka uzročnika *E. coli*, negativnih uzoraka je bilo 8. Na sljedećoj slici grafički je prikazan odnos između volumena uzorka i vremena detekcije pozitiviteta te vrijednosti inokuluma:



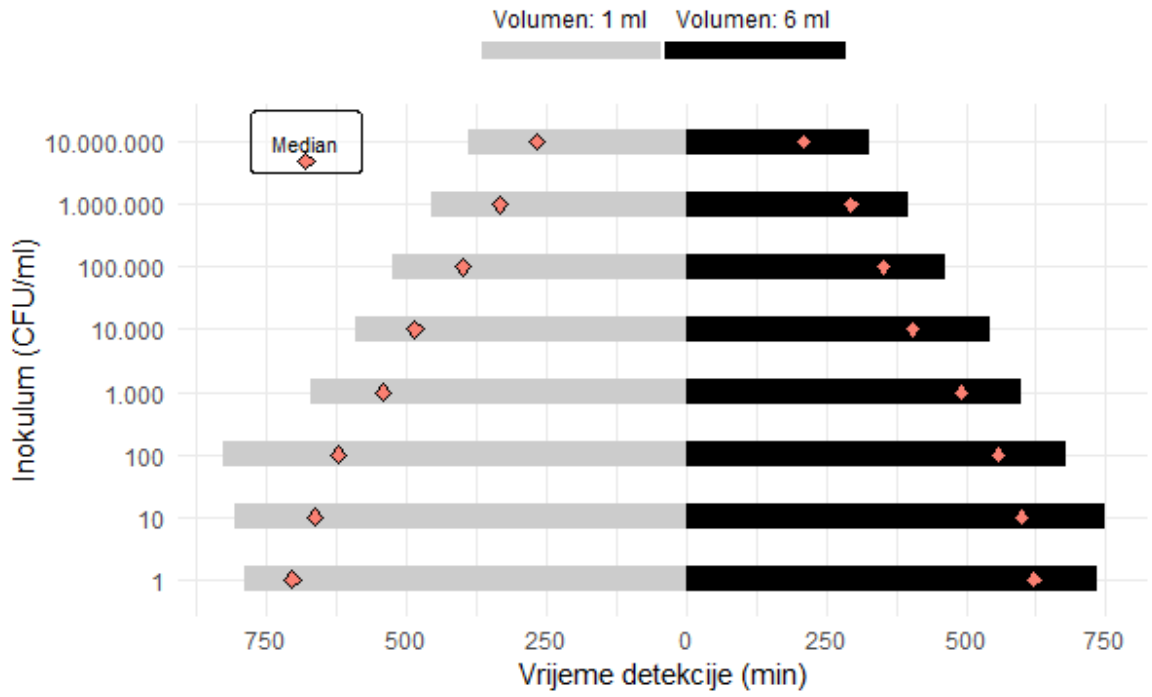
Slika 15. Odnos volumena, vremena detekcije pozitiviteta i inokuluma

Sa slike se može vidjeti kako kod niskog vremena detekcije prevladavaju veće vrijednosti inokuluma. Za ispitivanje koeficijenta korelacije koristio se Spearmanov koeficijent korelacije. Rezultati su dani u sljedećoj tablici:

Tablica 13. Korelacijska matrica

	Vrijeme detekcije pozitiviteta (min)	**Inokulum**
Volumen krvi (ml)	-0,14	-0,02
Vrijeme detekcije pozitiviteta (min)		-0,91***

Koeficijent korelacije između vremena potrebnog za detekciju pozitiviteta te inokuluma bio je jako visok i negativan, -0,91 te je bio značajan na razini značajnosti manjoj od 0,1 %. To znači da je za više vrijednosti inokuluma vrijeme potrebno za detekciju pozitiviteta bilo znatno niže. Dodatno nas je zanimalo da li postoji razlika između vremena detektiranja pozitiviteta za različite volumene uzoraka iste vrijednosti inokuluma. Grafički prikaz odnosa vremena detekcije i volumena uzorka za iste vrijednosti inokuluma dan je na sljedećoj slici:



Slika 16. Odnos volumena i vremena detekcija za iste vrijednosti inokuluma

Razlike su ispitane korištenjem Mann-Whitney U testa te su rezultati prikazani u Tablici 14.

Tablica 14. Razlike u vremenima detekcije obzirom na volumen uzorka za iste vrijednosti inokuluma

Inokolum (CFU/ml)	**1 ml**	**6 ml**	**p**
10^0	(625 - 789) 704,5	(565 - 735) 621,5	> 0,05
10^1	(573 - 807) 664	(523 - 747) 600	< 0,10
10^2	(517 - 829) 622	(466 - 678) 557	> 0,05
10^3	(461 - 671) 542	(411 - 600) 491	< 0,10
10^4	(395 - 592) 485	(354 - 542) 405	< 0,10
10^5	(338 - 525) 399	(288 - 464) 352	> 0,05
10^6	(281 - 456) 334	(240 - 396) 294	> 0,05
10^7	(216 - 388) 267	(180 - 328) 209	< 0,10

Za inokulume vrijednosti 10^1, 10^3, 10^4 I 10^7 opažene su statistički značajne razlike vremena detekcije pozitiviteta obzirom na volumen uzorka. Tako su oni uzorci s više volumena imali niža vremena detekcije. Kod ostalih vrijednosti inokuluma nisu opažene statistički značajne razlike.

5. RASPRAVA

Budući da su bakterijemija i fungemija jedne od najtežih kliničkih stanja čiji je uzrok ulazak patogenog mikroorganizama u krvotok bolesnika, a imaju po život opasne posljedice, vrlo je važno da se takvo stanje brzo i točno dijagnosticira. Za potvrdu dijagnoze infekcije uzrokovane mikroorganizmom hemokultura, kao primarno sterilan uzorak, ima velik klinički značaj u slučaju da dođe do detekcije mikroorganizma u uzorku. S obzirom na to da je hemokultura „zlatni standard" za dijagnostiku infekcije krvotoka, od velike je važnosti da uzorak bude adekvatan, odnosno, da se venepunkcija vrši u skladu s preporukama da bi se smanjila vjerojatnost lažnih rezultata.

U ovom istraživanju, za ispitivanje utjecaja različitih volumena krvi na vrijeme detekcije pozitiviteta različitih uzoraka krvi ukupno je prikupljen 1041 uzorak krvi pacijenata. Budući da je teško utvrditi točan prikupljeni volumen u uzorcima pacijenata, uzorcima je nakon venepunkcije određena točna masa vaganjem te je iz dobivene mase preko prethodno navedene formule određen volumen svakog pojedinačnog volumena. Od ukupno 415 aerobnih hemokultura pozitivnih je bilo 56 (13,49 %). Zatim, od 395 anaerobnih uzoraka njih 37 (9,37 %) je bilo pozitivno, a od 58 pedijatrijskih uzoraka pozitivno je rezultiralo 9 (15,52 %). Uzorci koji su prema formuli imali negativan volumen te Mycosis uzorci (ukupno 173 uzorka) nisu bili obuhvaćeni analizom. Do sličnog rezultata došlo je i u istraživanju Alfouzan W. A. i sur. (17) koji su u Kuvajtu proveli prospektivno istraživanje u periodu od 6 mjeseci gdje je navedeno da je od ukupno 5814 uzoraka udio pozitivnih aerobnih hemokultura bio 10,2 %, a udio anaerobnih 8,2 %. Također, autori su još naveli da u istraživanju kod aerobnih i anaerobnih uzoraka nije uočena razlika u vremenu do detekcije pozitiviteta kod uzoraka volumena do 10 mL i uzoraka volumena iznad 10 mL, što je u skladu s rezultatom ovog istraživanja jer kod uzoraka u aerobnim i anaerobnim bočicama prikupljenih za ovo istraživanje dobiven koeficijent korelacije nije bio statistički značajan, što znači da kod tih uzoraka volumen krvi i vrijeme do detekcije pozitiviteta međusobno ne koreliraju. Suprotno aerobnim i anaerobnim uzorcima, kod pedijatrijskih uzoraka u ovom istraživanju uočena je statistički značajna korelacija volumena krvi i vremena do detekcije pozitiviteta, odnosno, kod pedijatrijskih uzoraka s većim volumenom bilo je potrebno manje vremena do detekcije pozitiviteta. Neke studije došle su do različitih rezultata, tako su Bouza E. i sur. proveli istraživanje u trajanju od 6 mjeseci te analizirali ukupno 12643 uzorka hemokultura od kojih

je 2716 rezultiralo pozitivno. Autori su u svom istraživanju naveli da su, prema analizi uzoraka koje su prikupili, uzorci s većim volumenom bili povezani s većom stopom detekcije pozitiviteta, a povećanje stope detekcije BSI iznosilo je 3,3 % po svakom dodatnom mililitru krvi (18).

Nadalje, za ispitivanje korelacije volumena krvi, vremena do detekcije pozitiviteta i izoliranog uzročnika u ovom istraživanju također je analiziran 1041 uzorak hemokultura bolesnika. Najčešći gram-negativni izolirani uzročnik bila je *E. coli* s 12 (11,76 %) uzoraka, a najčešći gram-pozitivni uzročnik je *Staphylococcus spp.* izoliran u 48 (47,06 %) uzoraka. Sličan rezultat dobili su Lin P. i sur. koji su proveli retrospektivnu studiju u trajanju od 1. ožujka 2020. do 31. ožujka 2020. u Tajvanu gdje su analizom ukupno 5732 uzorka, od kojih je pozitivnih bilo 538 (9,4 %), utvrdili da je najčešći gram-negativni uzročnik također *E. coli* u 69 (15,4 %) uzoraka, a najčešći gram-pozitivni koagulaza negativni stafilokoki kod 77 (17,1 %) i *Staphylococcus aureus* kod 63 (14 %) uzorka (19).

U ovom istraživanju, najkraće vrijeme do detekcije pozitiviteta kod gram-negativnih bakterija imao je *Acinetobacter spp*. (530 minuta), zatim *Klebsiella spp.* s prosjekom od 596 minuta. Kod gram-pozitivnih bakterija najkraće vrijeme do detekcije pozitiviteta bilo je kod *Enterobacter spp.* s prosjekom od 643 minute. Najduže vrijeme za detekciju zabilježeno je kod *Candida spp.* (prosječno 2382 minute). Sličan rezultat dobili su Pan F. i sur. u retrospektivnoj studiji koja je trajala od 1. siječnja 2016. do 31. prosinca 2016. Prema rezultatima te studije, gram-negativne bakterije imale su značajno kraće vrijeme do detekcije pozitiviteta u usporedbi s gram-pozitivnim bakterijama. Najkraće vrijeme detekcije među gram-negativnim bakterijama zapaženo je kod *E. coli* (936 minuta), a među gram-pozitivnim bakterijama kod *Streptococcus spp.* (1040 minuta) (20).

Analizom 102 pozitivna uzorka u našem istraživanju je uočena statistički značajna korelacija kod izoliranog uzročnika *Corynebacterium spp*. te kod *Klebsiella spp*. izolata, što znači da je kod tih uzoraka veći volumen krvi povezan s kraćim vremenom detekcije pozitiviteta. U studiji Alfouzan, W. A. i sur. među ispitanim uzorcima u aerobnim i anaerobnim bočicama za hemokulturu nije uočena razlika u stopi izolacije uzročnika usporedivši bočice s preporučenim (adekvatnim) volumenom te bočice čiji je volumen veći, odnosno manji od preporučenog (17). Sukladno rezultatima studije Alfouzan, W. A. i sur., u našem istraživanju ispitivana je korelacija volumena krvi i vremena do detekcije pozitiviteta s obzirom na gram-pozitivne, gram-negativne bakterije i kvasce, a dobiveni koeficijent

korelacije nije bio statistički značajan stoga je zaključeno da te varijable međusobno ne koreliraju.

Kontaminacija hemokultura jest relativno česta pojava u praksi. Da bi se stopa kontaminacije smanjila poželjno je, uz ostale preporuke, prikupljati krv perifernom venepunkcijom. Neves L. i sur. proveli su šestomjesečnu prospektivnu opažajnu studiju u Sao Paolu te su naveli da kod 55 pacijenata čije su hemokulture bile pozitivne, kontaminacija u uzorku je utvrđena kod dva pacijenta (21). Što se tiče naših rezultata, točnije kod pedijatrijskih uzoraka, od ukupno osam uzoraka kod dva uzorka se vjerojatno radilo o kontaminaciji.

Za ispitivanje odnosa inokuluma, volumena i vremena do detekcije pozitiviteta proveden je eksperiment kojim su dobivena 144 uzorka volumena 1 mL i 6 mL od kojih je analizirano 136 pozitivnih uzoraka uzročnika *E. coli*. Nakon analize pozitivnih uzoraka dobiven je visok i negativan koeficijent korelacije, stoga je zaključeno da je za uzorke s višim inokulumom potrebno manje vremena do detekcije pozitiviteta, što potvrđuje prethodna saznanja da je za detekciju pozitiviteta u uzorcima s više bakterija po mililitru bilo potrebno manje vremena do detekcije pozitiviteta. Također, uspoređena su vremena do detekcije pozitiviteta uzoraka jednakih inokuluma, ali različitih volumena te je kod uzoraka inokuluma 10^1, 10^3, 10^5, i 10^7 uočena značajna razlika, odnosno, kod uzoraka čiji je volumen iznosio 6 mL bilo je potrebno manje vremena za detekciju pozitiviteta nego kod uzoraka volumena 1 mL, što potvrđuje važnost adekvatnog volumena za detekciju uzročnika u hemokulturama.

6. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem došlo je do sljedećih zaključaka:

1) U navedenom istraživanju kod aerobnih i anaerobnih uzoraka pacijenata nije uočena statistički značajna korelacija između inokuliranog volumena krvi i vremena detekcije pozitiviteta, no kod uzoraka pacijenata u pedijatrijskim bočicama postoji statistički značajna korelacija, za bočice u kojima je prikupljena veća količina krvi bilo je potrebno manje vremena za detekciju pozitiviteta.
2) Kod gram-negativnih bakterija, u usporedbi s gram-pozitivnim bakterijama i kvasnicama, zapaženo je da je za detekciju pozitiviteta bilo potrebno manje vremena.
3) Kod uzoraka čiji je bakterijski inokulum bio veći bilo je potrebno manje vremena za detekciju pozitiviteta.
4) Usporedbom uzoraka jednakog inokuluma, a različitog volumena opaženo je da je kod uzoraka volumena 6 mL bilo potrebno manje vremena za detekciju pozitiviteta nego kod uzoraka volumena 1 mL.

7. SAŽETAK

CILJEVI ISTRAŽIVANJA: Ciljevi su bili ispitati utjecaj različitih volumena krvi na vrijeme detekcije pozitiviteta, zatim ispitati korelaciju volumena krvi, vremena detekcije pozitiviteta i izoliranog uzročnika te naposljetku ispitati odnos inokuluma, volumena i vremena detekcije pozitiviteta.

USTROJ STUDIJE: Presječna studija.

MATERIJALI I METODE: Ispitanici istraživanja su pacijenti obaju spolova i svih dobnih skupina čije su hemokulture pristigle u mikrobiološki laboratorij KBC-a Osijek od 1. veljače do 31. ožujka 2023. godine. Također su analizirani uzorci dobiveni u eksperimentalnom dijelu istraživanja, ukupno 144 uzorka.

REZULTATI: Od ukupno 1041 uzorak pacijenata, 102 pozitivna uzorka (56 aerobnih, 37 anaerobnih i 9 pedijatrijskih) su obuhvaćena analizom. Najčešći izolirat bio je *Staphylococcus spp.* kod 48 uzoraka (47,06 %). Najduže vrijeme detekcije pozitiviteta bilo je za *Candida spp.* (prosjek 2382 minute), a najkraće za *Acinetobacter spp.* (prosjek 533 minute). Kod ispitivanja odnosa volumena krvi i vremena do detekcije pozitiviteta za pedijatrijske uzorke korelacija je iznosila -0,74. Kod *Corynebacterium spp.* i *Klebsiella spp.* izolata korelacija volumena i vremena detekcije bila je visoka i negativna. Kod 136 uzoraka dobivenih eksperimentom, korelacija inokuluma i vremena detekcije bila je -0,91, a za inokulume istih vrijednosti uočene su značajne razlike u vremenu detekcije pozitiviteta obzirom na volumen..

ZAKLJUČAK: Uzorci bolesnika većeg volumena inokulirani u pedijatrijski bujon imali su kraće vrijeme detekcije pozitiviteta. Kod 136 pozitivnih uzoraka dobivenih eksperimentom, uzorci s većim inokulumom imali su kraće vrijeme detekcije pozitiviteta, a kod uzoraka s jednakim inokulumom, a različitim volumenom, uzorci većeg volumena imali su kraće vrijeme detekcije pozitiviteta.

KLJUČNE RIJEČI: hemokultura, infekcije krvotoka, volumen krvi, vrijeme do detekcije pozitiviteta, bakterijski inokulum

8. SUMMARY

EXAMINATION OF THE INFLUENCE OF BLOOD VOLUME ON THE TIME OF POSITIVITY DETECTION IN THE SYSTEM FOR CONTINUOUS MONITORING OF BLOOD CULTURES

OBJECTIVES: The objectives were to examine the influence of different volumes of blood on the time to positivity (TTP), then to examine the correlation of blood volume, time to positivity and the isolated pathogen, and finally to examine the relationship between inoculum, volume and time to positivity.

STUDY DESIGN: Cross-sectional study.

MATERIALS AND METHODS: The subjects of the research are patients of both sexes and all age groups whose blood cultures arrived at the microbiological laboratory of KBC Osijek from February 1 to March 31, 2023. The samples obtained in the experimental part of the research were also analyzed, a total of 144 samples..

RESULTS: From a total of 1041 patient samples, 102 positive samples (56 aerobic, 37 anaerobic and 9 pediatric) were included in the analysis. The most common isolate was *Staphylococcus spp.* in 48 BC samples (47.06 %). The longest time to positivity was for *Candida spp*. (avg. 2382 minutes), and the shortest for *Acinetobacter spp.* (avg. 533 minutes). When examining the relationship between blood volume and TTP for pediatric BC, the correlation was -0.74. In the case of *Corynebacterium spp.* and *Klebsiella spp.* isolates, the correlation of volume and TTP was high and negative. In the case of 136 positive BC obtained by experiment, the correlation of inoculum and TTP was -0.91, and for inoculums of the same values, significant differences were observed in the TTP with regard to volume.

CONCLUSION: Pediatric samples from patients with higher blood volume had a shorter TTP. In the 136 samples obtained by the experiment, samples with a larger inoculum had a shorter TTP, and in samples with the same inoculum but different volume, samples with a larger volume had a shorter TTP.

KEY WORDS: blood culture, bloodstream infections, blood volume, positivity detection time, bacterial inoculum

9. LITERATURA

(1) Smith DA, Nehring SM. Bacteremia. [Updated 2022 Jul 31]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441979/

(2) Oliveira VK, Ruiz Lda S, Oliveira NA, Moreira D, Hahn RC, Melo AS, Nishikaku AS, Paula CR. Fungemia caused by Candida species in a children's public hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014 Jul-Aug;56(4):301-5. doi: 10.1590/s0036-46652014000400006. PMID: 25076430; PMCID: PMC4131815.

(3) Beader N, Bedenić B, Budimir A. Klinička mikrobiologija, odabrana poglavlja. Zagreb: Medicinska naklada; 2019, str. 57 – 63.

(4) Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA; ESCMID Study Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis (ESGBIES). Bloodstream infections - Standard and progress in pathogen diagnostics. Clin Microbiol Infect. 2020 Feb;26(2):142-150. doi: 10.1016/j.cmi.2019.11.017. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31760113.

(5) Washington JA. Principles of Diagnosis. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 10. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8014/

(6) Nannan Panday RS, Wang S, van de Ven PM, Hekker TAM, Alam N, Nanayakkara PWB. Evaluation of blood culture epidemiology and efficiency in a large European teaching hospital. PLoS One. 2019 Mar 21;14(3):e0214052. doi: 10.1371/journal.pone.0214052. PMID: 30897186; PMCID: PMC6428292.

(7) Bullock B, Benham MD. Bacterial Sepsis. [Updated 2022 Jun 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537054/

(8) Tjandra KC, Ram-Mohan N, Abe R, Hashemi MM, Lee JH, Chin SM, Roshardt MA, Liao JC, Wong PK, Yang S. Diagnosis of Bloodstream Infections: An Evolution of Technologies towards Accurate and Rapid Identification and Antibiotic Susceptibility Testing. Antibiotics

(Basel). 2022 Apr 12;11(4):511. doi: 10.3390/antibiotics11040511. PMID: 35453262; PMCID: PMC9029869.

(9) Gonzalez MD, Chao T, Pettengill MA. Modern Blood Culture: Management Decisions and Method Options. Clin Lab Med. 2020 Dec;40(4):379-392. doi: 10.1016/j.cll.2020.07.001. Epub 2020 Sep 19. PMID: 33121610; PMCID: PMC7501519.

(10) Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. Clin Microbiol Infect. 2015 Apr;21(4):313-22. doi: 10.1016/j.cmi.2015.01.003. Epub 2015 Jan 16. PMID: 25753137.

(11) Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA; ESCMID Study Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis (ESGBIES). Bloodstream infections - Standard and progress in pathogen diagnostics. Clin Microbiol Infect. 2020 Feb;26(2):142-150. doi: 10.1016/j.cmi.2019.11.017. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31760113.

(12) Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti JJ, Tattevin P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. Front Microbiol. 2016 May 12;7:697. doi: 10.3389/fmicb.2016.00697. PMID: 27242721; PMCID: PMC4863885.

(13) Huber S, Hetzer B, Crazzolara R, Orth-Höller D. The correct blood volume for paediatric blood cultures: a conundrum? Clin Microbiol Infect. 2020 Feb;26(2):168-173. doi: 10.1016/j.cmi.2019.10.006. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31654793.

(14) Payer-Pal M, Mareković I, Tambić Andrašević A, HDKM Smjernice za uzimanje , obradu i interpretaciju rezultata hemokultura. Dostupno na: https://www.hdkm.hr/smjernice-hdkm/ (posjećeno 2. 2. 2023.)

(15) BACTEC™ Automated blood culture, 9240/9120/9050 Dostupno na: https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-9000bc2.pdf (posjećeno 5. 4. 2023.)

(16) Henning C, Aygül N, Dinnétz P, Wallgren K, Özenci V. Detailed Analysis of the Characteristics of Sample Volume in Blood Culture Bottles. J Clin Microbiol. 2019 Jul 26;57(8):e00268-19. doi: 10.1128/JCM.00268-19. PMID: 31092594; PMCID: PMC6663918.

(17) Alfouzan, W. A., Azizieh, F. Y., & Dhar, R. (2014). Correlation between inoculum volume, positivity rates and microorganisms isolated from blood cultures. African Journal of Microbiology Research, 8(28), 2705-2709

(18) Bouza E, Sousa D, Rodríguez-Créixems M, Lechuz JG, Muñoz P. Is the volume of blood cultured still a significant factor in the diagnosis of bloodstream infections? J Clin Microbiol. 2007 Sep;45(9):2765-9. doi: 10.1128/JCM.00140-07. Epub 2007 Jun 13. PMID: 17567782; PMCID: PMC2045273.

(19) Lin PC, Chang CL, Chung YH, Chang CC, Chu FY. Revisiting factors associated with blood culture positivity: Critical factors after the introduction of automated continuous monitoring blood culture systems. Medicine (Baltimore). 2022 Jul 29;101(30):e29693. doi: 10.1097/MD.0000000000029693. PMID: 35905221; PMCID: PMC9333494.

(20) Pan F, Zhao W, Zhang H. Value of Time to Positivity of Blood Culture in Children with Bloodstream Infections. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2019 Jan 10;2019:5975837. doi: 10.1155/2019/5975837. PMID: 30733846; PMCID: PMC6348829.

(21) Neves L, Marra AR, Camargo TZ, dos Santos MC, Zulin F, da Silva PC, de Moura NA, Victor Eda S, Pasternak J, dos Santos OF, Edmond MB, Martino MD. Correlation between mass and volume of collected blood with positivity of blood cultures. BMC Res Notes. 2015 Aug 28;8:383. doi: 10.1186/s13104-015-1365-8. PMID: 26311144; PMCID: PMC4551380.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Magdalena Čamber

Datum, godina i mjesto rođenja: 16.9.1999. Posušje

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa prebivališta: Dubrave 27, 88247 Vir, Posušje (BiH)

Telefon: +385996734739

E-mail: cambermagdalena@gmail.com

OBRAZOVANJE

2006.- 2014. Osnovna škola „Franica Dall´era“ Vir

2014. - 2018. Opća gimnazija „Fra Grga Martić“ Posušje

2018. – 2021. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Split – Preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2021. – 2023. Medicinski fakultet Osijek – Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

RADNO ISKUSTVO

2020. KBC Split – rad preko studentskog centra u laboratoriju

OSOBNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinski jezik: hrvatski

Drugi jezici: engleski i njemački

Računalne vještine i kompetencije: poznavanje Microsoft Office paketa, Internet

2018. vozačka dozvola B kategorija