

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			МИ-10-007
Пиокултуре				
Страна 1 од 4	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	1	2021-04-15	др Санда Лазих руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Дијагностичке процедуре у лабораторији за пиокултуре.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Принцип методе је засијавање узорка на одговарајуће подлоге које ће омогућити пораст очекиваних патогена у тој регији.

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

Принцип методе је засијавање узорка на одговарајуће подлоге које ће омогућити пораст очекиваних патогена у тој регији.

4. ВРСТА УЗОРКА

Садржај апсцеса - гној, материјал из дубоке ране, уха, параназалних синуса, материјал са десни, непца и околине зуба, зубни канал, жуч, дуоденални сок, желудчани садржај и испирак желуца, трансудати, ексудати, исјечци ткива и органа.

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

У складу са упутством УП-10-135: *Упутство за узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику.*

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

У складу са упутством УП-10-135: *Упутство за узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику.*

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

Реагенси: Крвни агар, Ендо агар, глукозни бујон, Милер Хинтон подлога, антибиограм таблете, физиолошки раствор, подлоге за биохемијску серију (троструки шећер, пептонска вода, Симонсов цитратни агар, манитол, лактоза, Кристенсен уреа, метил ред), аглутинарајући серуми за идентификацију стрептокока и стафилокока, картице за ВИТЕК 2 апарат, раствор метиленско плаво, реагенси за бојење по Граму. Апсолутни алкохол или у недостатку 96% Раствор неутрално црвено 1г, ескулин, жељезни хлорид, плазма, Ковачев реагенс, таблете (Новобиоцин, Оксидаза, Бацитрацин), 30% водоник-пероксид, тиогликолатна подлога, гас пак системи.

Апарати: Фрижидер, инкубатор, вортекс, дензитометар, центрифуга, микроскоп, ВИТЕК 2, плинска боца са пламеником, лонац за анеробну култивацију.

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Анализу спроводити у уобичајеним микроклиматским условим у лабораторији, 20-24° Целзијуса, у складу са УП-10-023: *Употреба средстава личне заштите у Служби за микробиологију са паразитологијом* и УП-10-142: *Мјере заштите на раду у Служби за микробиологију са паразитологијом*. Све узорке, микробиолошке културе и инокулисане продукте сматрати потенцијално инфективним и тако их третирати. Сав материјал у контакту са узорком и узорак након завршетка анализе аутоклавирати.

Болница Бијељина	Страна 2 од 4	Издање:	Важи од:	МИ-10-007
		1	2021-04-15	

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Није примјењиво.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

Обрада узорка: Бактериолошка обрада подразумијева прављење микроскопских препарата и засијавање на одговарајуће подлоге које се даље култивишу аеробно и/или анаеробно.

1. Директан микроскопски препарат за директну микроскопију

Брис се припрема у виду танког размаза на чистом предметном стаклу и потом боји по Граму. Гнојни садржај се стерилном пипетом или езом нанесе на чисто предметно у количини од једне капи, размаже и боји по Граму.

Извјестити о присуству леукоцита и (описно) микроорганизама.

2. Култивација

- крвни агар: аеробно, 35-37°C, 16-24 h,
- ендо агар: аеробно, 35-37°C, 16-24 h,
- Сабуро, 35-37°C, 16-24 h, затим на собној још 16-24 h,
- тиогликолат бујон: аеробно, 16-24 h– пресијава се по потреби, аеробно (крвни агар и/или ендо агар) и/или анаеробно (подлога за анаеробе),
- глюкозни бујон, аеробно, 35-37°C, 16-24 h ,пресијава се по потреби на крвни агар и ендо агар након 24h,
- подлога за анаеробне бактерије: анаеробно, 35-37°C, 48 h (може и до 5 дана),
- чоколадни агар: у условима са 5-10% CO₂, 35-37°C, 48 h (читање свакодневно),

Додатно, у случају примарног перитонитиса код жена и простатичног апсцеса:

- Чоколадни агар , који се инкубира у 5% CO₂, 48h.

Тако се при сумњи да је узрочник анаеробна бактерија, засијавање материјала захтијева анаеробне подлоге и услове. Анаеробни услови се могу обезбиједити на више начина, а најчешће се користе боксови за анаеробне бактерије (посуда са поклопцем који се херметички затвара). У такав бокс се стављају засијане подлоге, а анаеробни услови у лонцу се обезбјеђују убацивањем у лонац кесице која генерише анаеробне услове. Овакав херметички затворен лонац, у ког смо ставили засијање хранљиве подлоге, ставља се у инкубатор на 37°C 48 сати. Ако је раст недовољан, подлоге се могу реинкубирати сљедећих 24 до 48 сати. За факултативно анаеробне бактерије, микроаерофилни услови се могу добити стављањем запаљене свијеће у лонац са засијаним подлогама крвног агра, а лонац се потом ставља у инкубатор на 37°C 24 до 48 сати. При сумњи на анаеробног узрочника, материјал се засијава у епрувете са тиогликолатном подлогом. Засијавање се врши Пастеровом пипетом дубоко у подлогу, епрувете се затварају чепом и прати се пораст бактерија при дну епрувете након инкубације на 37°C од 24 до 48 сати. Тиогликолатне подлоге не треба инкубирати под анаеробним условима, зато што садрже редуковане супстанце, тј. већ обезбјеђују анаеробне услове. Крвни агар је добар медиј за изоловање већине анаеробних бактерија, али неке захтијевају високо специјализоване подлоге (К.А. обогаћен факторима раста) или се прави анаеробни К.А. додавањем једног или више специфичних антибиотика који спречавају раст аеробних и факултативно анаеробних бактерија (погодна за узорке узете из подручја са мјешовитом микрофлором). Анаеробну култивацију треба радити по захтјеву клиничара, када узорак има непријатан мирис или резултат Грам бојења индикује могућност анаеробне инфекције (присуство полиморфних мјешовите флоре Г⁺ и Г⁻ штапића и кока, присуство Г-фузиформин штапића или присуство Г⁺ штапића са задебљањем). Након 48 сати прати се

Болница Бијељина	Страна 3 од 4	Издање:	Важи од:	МИ-10-007
		1	2021-04-15	

раст бактерија на аеробном и анаеробном крвном агару, бактерије са истим изгледом које расту аеробно и анаеробно сматрају се факултативно анаеробне. Колоније које се појављују само анаеробно су вјероватно анаеробне и треба их субкултивисати на два К.А. (један се ставља у лонац са свијећом, а други анаеробно), ако се појави само у анаеробиози од те чисте културе треба даље покушати идентификацију анаероба. Ако се посматра раст у дубини анаеробне подлоге, субкултивација се изводи у аеробним и анаеробним условима и даље се врши исти поступак. Идентификација се може вршити и на ВИТЕК 2 апарату према упуту произвођача приложеном уз апарат. Иначе сваки тип колонија захтијева испитивање и бојење по Граму. Антибиограм тест се не изводи рутински (нема стандардног диск-дифузионог теста).

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Редовно контролисати подлоге које се припремају у лабораторији, према важећем упутству.

Комерцијалне, готове подлоге контролисати на пријему:

- да није Петри плоча оштећена, да није агар оштећен, да није неједнаке дебљине,
- да није наступила хемолиза агара,
- да нема трагова залеђавања подлоге, контаминације, сасушивања подлоге.

Такве подлоге се не прихватају у рад и враћају се добављачу.

Контролисати температуру и zasiћеност угљен диоксидом у инкубатору.

Контролисати температуре фрижидера у којима се чувају реагенси.

За све узорке узете ван лабораторије при пријему утврдити да ли су узети и транспортовани у складу са важећим процедурама.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ

Уколико је пацијент под антибиотском терапијом постоји могућност лажно негативног резултата. Препорука је да се узорак за културу узима прије примјене антибиотика.

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

Није примјењиво.

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Није примјењиво.

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Није примјењиво.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА

Није примјењиво.

17. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ

Није примјењиво.

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

Могући патогени:

- *Staphylococcus aureus*,
- *Streptococcus β haemolyticus*,

Болница Бијељина	Страна 4 од 4	Издање:	Важи од:	МИ-10-007
		1	2021-04-15	

- Друге стрептококе,
- *Enterococcus*,
- Ентеробактерије,
- *Pseudomonas*,
- Анаероби,
- *Actinomyces*,
- *Nocardia*,
- *Neisseria gonorrhoeae* и други микроорганизми,
- Гљивице.

У гноју и аспирату ране било који организам може имати клинички значај.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Уколико је пацијент под антибиотском терапијом постоји могућност лажно негативног резултата. Препорука је да се узорак за културу узима прије примјене антибиотика.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology, Koneman E.W. , , Philadelphia 1997.

Basic laboratory procedures in clinical bacteriology, J. Vandepitte, K. Engback, Piot & C.C. Henck, World Health organization, Geneva, 1991.

Практикум из микробиологије и имунологије, В. Арсић ...[ет. ал], Савремена администрација, Београд, 2000.

Медицинска микробиологија, Е. Jawetz, J.L. Melnick, Е.А. Adelberg, превод 20. издања [В.Арсич... е а.]; Савремена администрација, Београд, 1998.

Лабораторијска дијагностика у клиничкој бактериологији, др Љ. Мугоша и сар., Министарство здравља Црне Горе, 2012.