

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			МИ-10-025
Обрада узорака за микобактериолошку дијагностику (култура по Lowenstein-у)				
Страна 1 од 13	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	1	2021-09-15	др Санда Лазин руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Културом по Lowensteinу радимо изолацију микобактерија и идентификацију *Mycobacterium tuberculosis*. Културу шаљемо у надлежну лабораторију на испитивање осјетљивости на лијекове и евентуалну идентификацију нетуберкулозних микобактерија.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Изолација микобактерија у култури, на Lowenstein подлози, након обраде узорака.

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

Изолација микобактерија у култури је много осјетљивији дијагностички метод. У добро организованим лабораторијама културе су позитивне ако је присутно 10 бацила/мл узорка. Међутим, у многим лабораторијама култивисање не достиже поменути осетљивост. Узрок мање осетљивости култивисања могу бити сви поступци који смањују вијабилност микобактерија, као што су дуг транспорт узорака, прејака обрада и неадекватно центрифугирање.

4. ВРСТА УЗОРКА

Различити узорци за дијагностику туберкулозе културом по Lowensteinу.

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

Lowenstein подлога, 4%NaOH; 2,94% Na цитрат; фосфатни пуфер 0,067 mol/l, pH 6,8; NALC; дестилована вода, биосигурносни кабинет класе II, фрижидер, центрифуга, микроскоп, плинска боца са пламеником, шејкер.

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Аналізу 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*, УП-10-026: *Упутство за употребу дезинфицијенаса у лабораторији за дијагностику туберкулозе*, УП-10-085: *Упутство за рад са биосигурносним кабинетом у лабораторији за дијагностику туберкулозе*, УП-10-132: *Безбједно извођење обраде клиничких узорака и изоловања бацила туберкулозе на хранљивим подлогама.*

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 13	Издање:	Важи од:	МИ-10-025
		1	2021-09-15	

Материјал и опрема намијењени за обраду за рад у лабораторији за туберкулозу користити искључиво у том простору и не смије се преносити из једног радног подручја у други. У сваком подручју рада носити рукавице, заштитни мантил и по потреби маску који се одлажу прије изласка из тб лабораторије. Послије сваког поступка у току обраде потребно је извршити дезинфекцију радне површине. По престанку рада у лабораторији врши се чишћење и дезинфекција лабораторије. Све процедуре обраде узорака за дијагностику туберкулозе радити у складу са постојећим упутствима о биосигурности у тб лабораторији.

Сав отпад из лабораторије за дијагностику ТБ 2. нивоа сматра се потенцијално инфективним и мора се аутоклавирати или спалити. Пластичне посуде за узорке, езе за једнократну употребу, пластичне пипете и употребљене рукавице могу се одлагати у пластичне кесе за одлагање инфективног материјала. Затворене кесе треба прослједити на аутоклавирање/спаљивање. Препорука је да на сваком радном мјесту постоји посуда за одлагање инфективног материјала. Посуда треба да буде неломљива (пластика, метал), са поклопцем и да садржи одговарајући дезинфицијенс. У овакве посуде обавезно се одлажу материјали који ће након стерилизације бити поново употребљени, јер је за њих прије стерилизације неопходна деконтаминација.

Поломљено стакло треба одлагати у посуде од материјала који је отпоран на предмете оштрих ивица и са поклопцем на навој. Такве посуде треба обиљежити ознаком „ОШТРО“ и не смију се пунити до врха. Када су испуњене до три четвртине запремине, треба их ставити у контејнер за инфективни отпад предвиђен за аутоклавирање/спаљивање. За аутоклавирање отпада из микобактериолошких лабораторија препоручују се следећи услови: температура 121°C током 45 минута.

8.1. Комора за безбиједан рад

Сви поступци са могуће инфективним материјалом морају се изводити у комори за безбиједан рад која представља примарну баријеру заштите. Правилна употреба коморе и примјена добрих микробиолошких техника су од кључног значаја за безбиједан рад у лабораторијама 2. нивоа дијагностике ТБ. Евиденција рада биосигурносног кабинета се врши на обрасцу ОБ-10-335: *Евиденција употребе и одржавања биосигурносног кабинета*.

8.2. Вентилација

Кључна секундарна баријера је вентилација у лабораторији односно једносмјерни ток ваздуха у лабораторији од „чистог“ ка „прљавом“, у складу са процесом рада, и одговарајући број измјена ваздуха, најмање 6 до 12 током једног сата. Примјена природне вентилације није препорука за лабораторије за дијагностику ТБ у којима је ризик од настанка аеросола умјерено висок и висок, јер у овим лабораторијама прозори стално треба да буду затворени. Препорука је да се одговарајућа вентилација може постићи примјеном комора за безбиједан рад које треба да усмјере ток ваздуха од „чистог“ ка „прљавом“ дијелу лабораторије, у складу са процесом рада, и коначно избацивање ваздуха из лабораторије у спољашњу средину.

8.3. УВ лампе

Поред вентилације, друга веома значајна мјера контроле средине у лабораторијама за дијагностику ТБ у којима је ризик од настанка аеросола умјерено висок и висок су УВ лампе. УВ лампе одговарајућих карактеристика постављене и одржаване на исправан начин представљају веома ефикасну и економичну мјеру контроле средине. У питању су извори УВ зрачења таласне дужине 254 нм који обезбјеђују бактерицидно дјеловање у горњим дјеловима простора лабораторије, а истовремено су безбиједни за особље лабораторије, односно извори УВ зрачења који раде током цјелокупног радног времена.

Болница Бијељина	Страна 3 од 13	Издање:	Важи од:	МИ-10-025
		1	2021-09-15	

8.4. Простор/радна површина

Карактеристике и дизајн лабораторијског простора такође су важна секундарна заштитна баријера за особље. Ове лабораторије требало би да буду у дијелу зграде одвојеном од осталог особља и пацијената дате установе. Улаз у лабораторију мора бити означен на одговарајући начин (знак биохазарда). Лабораторије треба да имају довољно простора тако да је омогућен неометан рад, одржавање и чишћење. Зидови, под и таваница треба да буду глатки и погодни за чишћење прањем. Под мора бити од материјала који има квалификацију „отпоран на клизање“. Простор мора бити добро освијетљен за све планиране активности; освјетљене треба да буде постављено тако да се избјегну одсјаји и сијенке. На прозоре не треба ставити завесе. Простор за одлагање личних ствари особља као и простор за одмор и исхрану особља морају бити одвојени од радног дијела лабораторије.

Кључна радна површина у лабораторијама са умјерено високим ризиком од настанка аеросола је површина у комори за безбједан рад и треба да задовољи опште захтјеве за радне површине: отпорност на воду, дезинфицијенсе који се користе и умјерено високу температуру. На радним површинама треба држати само предмете и реагенсе који се користе у свакодневном раду. Простор између и испод лабораторијског намјештаја и опреме мора бити доступан за чишћење. На лабораторијски намјештај не смију се стављати покривачи украсне или друге намјене од тканина.

8.5. Смањивање ризика за настанак аеросола

- Посуде са узорцима треба отворати пажљиво и полако. Приликом пријема узорка провјерити да ли су посуде за узорке добро затворене. Непотпуно затворене посуде треба одбацити, али ако ипак остају у раду, обавезно их треба пребрисати дезинфицијенсом.
- Не препоручује се употреба металних еза које се стерилишу жарењем и стаклених пипета, већ се препоручују пластичне езе и пипете за једнократну употребу. Ако се изводи стерилизација езе жарењем, препоручују се затворени инцинератори. Прије стерилизације езе жарењем, у затвореном инцинератору или на отвореном пламену, обавезно је чишћење езе у посуди са алкохолом и пијеском.
- Током пипетирања не смије се на силу истискивати могуће инфективна течност из пипете, као ни ваздух из пипете у могуће инфективну течност. Када се користи пипета за додавање реагенса у могуће инфективну течност, пипету треба прислонити уз унутрашњи зид посуде и течност полако и пажљиво истиснути. За мијешање течности не смије се користити наизмјенично понављано пуњење и пражњење пипете. Ако се користе микропипете, у посуду се улази само наставком и мора се водити рачуна да сама микропипета не дође у контакт са могуће инфективном течношћу. Када се из епрувете одлива течност, епрувета се мора држати под одговарајућим углом тако да течност полако отиче низ зид епрувете и затим низ зид посуде за одливање без прскања.
- Препорука је да се посуде након вортексирања, центрифугирања и мијешања оставе затворене током 10 минута, што омогућава слијегање аеросола. Током центрифугирања постоји могућност настанка инфективног аеросола. Центрифуге морају имати квалификацију „аеросол-тигхт“ и корпе морају имати одговарајуће поклопце. Центрифуга је уобичајено смјештена у отвореном лабораторијском простору, односно ван коморе за безбједан рад, али се корпе пуне и припремају за центрифугирање у комори. Поклопац са корпи након центрифугирања скида се такође искључиво у комори.

Болница Бијељина	Страна 4 од 13	Издање:	Важи од:	МИ-10-025
		1	2021-09-15	

- за прављење размаза из седимента или са култура користити дрвене штапиће или једнократне езе. Приликом прављења размаза штапићем или езом покрети морају бити спори и уједначени, како би се смањило стварање аеросола. Размазе током сушења на ваздуху не треба помјерати. Размази морају бити потпуно суви прије фиксирања топлотом. Најмање безбиједан начин фиксирања препарата је на отвореном пламену, јер је праћен настанком аеросола. Фиксирање размаза из седимента и из културе стога треба радити у комори за безбиједан рад. Извијестан број бацила ТБ задржава вијабилност и након фиксирања, без обзира на начин фиксирања, тако да је до завршетка поступка бојења неопходна примјена рукавица приликом руковања препаратима.

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Није примјењиво.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

Узорци за дијагностику туберкулозе који потичу из колонизованих регија (спутум, бронхоалвеоларни лават, ларингеални брис, гастрични лават, урин, кожа, обдукциони материјал) контаминирани су физиолошком микрофлором, за разлику од узорака из примарно стерилних регија (плеурални ексудат, ликвор, лимфни чворови, синовијална течност, ткиво, крв, гној из „хладног“ апсцеса). Ако се узорак из колонизованих регија засије директно на хранљиву подлогу, умножиће се брзорастуће бактерије физиолошке микрофлоре и раст микобактерија биће маскиран или инхибиран. Стога је обавезна фаза микобактериолошке дијагностике обрада узорака. Обрадом узорака постиже се:

1. дигестија (ликвефакција) узорка - разграђује се мукус и ослобађају микобактерије од слузи; истовремено се ослободи и пропратна микро-флора од слузи и тада на њу могу дјеловати хемикалије које се користе за деконтаминацију;
2. деконтаминација узорка – уништава се пропратна бактеријска флора;
3. концентрација бактерија центрифугирањем – јер су микобактерије присутне у малом броју у узорку.

Не постоји идеалан метод обраде чијом примјеном би селективно била уништена само пропратна микрофлора без оштећења микобактерија. Изабрани начин обраде треба да обезбиједи комплетну дигестију узорка и ефикасно уништавање пропратне флоре, при чему ће вијабилност микобактерија бити очувана. Преживљавање микобактерија у току обраде зависи од:

- врсте и концентрације средства за дигестију и деконтаминацију,
- дужине трајања обраде узорака растворима за дигестију и деконтаминацију,
- брзине центрифугирања, и
- температуре у току центрифугирања.

Ниједан процес обраде не омогућава убијање цјелокупне пропратне микрофлоре, као ни преживљавање свих присутних микобактерија. Стога се сматра да контаминација мањег броја подлога другом флором указује на преживљавање довољног броја микобактерија у току обраде. Дозвољен проценат контаминације на чврстим хранљивим подлогама је 2-5% а на течним подлогама 5-10%. Већи проценат контаминације подлога може настати услед исувише благе обраде (мања концентрација средстава за деконтаминацију или краћа обрада) или ако је прошло више дана од узимања узорака до обраде. Одсуство контаминације подлога указује на „прејаку“ обраду, у току које су убијени и пратећи микроорганизми и микобактерије, што може бити разлог постојања лажно негативних култура.

Болница Бијељина	Страна 5 од 13	Издање:	Важи од:	МИ-10-025
		1	2021-09-15	

1. Обрада спутума

Узорке спутума након пријема треба држати у фрижидеру до обраде.

У лабораторији спутум не смије бити на собној температури дуже од 1 сат.

Вријеме од узимања до обраде узорака спутума не смије бити дуже од 72 сата.

ОБРАДА СПУТУМА НАТРИЈУМ-ХИДРОКСИДОМ– МОДИФИКОВАНИ МЕТОД ПО RETROFFU.

Натријум-хидроксид је токсичан како за микроорганизме контаминанте, тако и за *M. tuberculosis*, те је неопходно строго поштовати вријеме обраде. Примјеном ове метода обраде 60% до 90% микобактерија у узорку може бити убијено дејством NaOH. Поред тога, током центрифугирања узорака долази до додатног пропадања микобактерија присутних у узорку. Овај метод обраде користи се само за узорке који се засијавају на чврсте хранљиве подлоге.

За обраду се узима 2 до 5 ml спутума. Ако је запремина узорка мања од 2 ml, мањи је проценат позитивних култура, а ако је запремина већа од 5 ml, већи је проценат контаминираних подлога. Евиденција прављења и чувања реагенса се води на обрасцу ОБ-10-336: *Евиденција припреме раствора за NALC-NaOH метод.*

Реагенси:

4% натријум хидроксид, NaOH

- 4g NaOH, висока чистоћа,
- 100 ml дестиловане воде.

Растворити NaOH у дестилованој води. Разлити у епрувете по 2 ml раствора. Стерилисати у аутоклаву на 121°C током 20 минута. Стерилни раствор NaOH може се чувати у фрижидеру на +4°C до 6 мјесеци.

фосфатни пуфер 0,067 mol/l, pH 6,8

- Раствор А: динатријум фосфат 0,067 mol/l

Растворити 9,47 г Na₂HPO₄ у 1 l дестиловане воде.

- Раствор Б: калијум фосфат 0,067 mol/l

Растворити 9,07 г KH₂PO₄ у 1 l дестиловане воде.

Помијешати 50 ml раствора А и 50 ml раствора Б. Одредити pH помоћу пехаметра; по потреби за подешавање pH користити 10% фосфорну киселину или 10% NaOH. Разлити фосфатни пуфер у епрувете у количини која одговара запремини епрувете за центрифугирање (нпр. по 50 ml пуфера када се користе епрувете од 50 ml за центрифугирање). Стерилисати у аутоклаву на 121°C током 20 минута, обиљежити и чувати у фрижидеру на +4°C неколико недеља. Након обраде узорака остаци пуфера се могу спојити, аутоклавирати и поново користити.

Поступак:

- Ван биосигурносног кабинета обиљежити конусну епрувету за центрифугирање (лабораторијски идентификациони број узорка), предметна стакла и двије епрувете са хранљивом подлогом (лабораторијски идентификациони број узорка, име и презиме, датум засијавања).

Болница Бијељина	Страна 6 од 13	Издање:	Важи од:	МИ-10-025
		1	2021-09-15	

- Пипетом сипати до 5 мл испитиваног спутума у епрувету за центрифугирање. Маркером означити запремину спутума у епрувети потом додати исту запремину 4% NaOH.
- Епрувету затворити. Садржај промијешати на вортексу или ручно. Оставити на собној температури 15 минута.
- Налити фосфатни пуфер до нивоа који је 2 цм испод врха епрувете (нпр. до ознаке 50 мл на епрувети).
- центрифугирати 15 минута, на 3000xG, на 8 степени.
- После центрифугирања не отварати епрувете 5 минута, колико је потребно да се слегне аеросол у њима. Потом пажљиво одлити супернатант у посуду за одлагање отпадног инфективног материјала.
- у седимент додати 1-2 мл фосфатног пуфера.
- Пипетом засијати по 2-4 капи (0,1-0,2 мл) седимента на двије чврсте хранљиве подлоге.
- Направити препарат од једне капи седимента.

Обрада узорка Н-ацетил-Л-цистеин – натријум хидроксидом (NALC-NaOH метод)

Н-ацетил-Л-цистеин (NALC) разграђује мукус у узорку и тиме омогућава коришћење ниже концентрације NaOH за обраду. Натријум цитрат везује јоне тешких метала из узорка, који могу инактивирати NALC. Почетна концентрација NaOH је 4%. Овом раствору се додаје иста запремина раствора натријум-цитрата, тако да је у радном раствору концентрација NaOH 2%. Када се спутуму дода иста запремина овако припремљеног раствора NaOH-NALC-цитрат, финална концентрација NaOH је 1%.

Узорци након обраде NALC-NaOH методом могу се засејати и на чврсте и на течне хранљиве подлоге (нпр. MGIT подлоге – Mycobacteria growth indicator tube). Број позитивних култура након обраде узорка овим поступком је већи, јер у току обраде само око 30% микобактерија буде убијено. За обраду појединачних узорка потребно је око 40 минута; ако се истовремено обрађује 20 узорка, вријеме обраде је око 60 минута.

Недостатак овог метода обраде је што NALC у раствору брзо губи активност и зато се раствор мора припремати свакодневно.

После деконтаминације и центрифугирања обавезно ресуспендовати седимент у 10 пута већем волумену пуфера или воде. На тај начин се разблажују евентуално присутне супстанце које могу инхибирати раст микобактерија.

Седимент који је остао после засејавања треба чувати у фрижидеру једну недељу. Када се уочи контаминација подлоге, сачувани седимент поново обрадити и засијати на нову подлогу. За дуже чување седимент пребацити у епрувете са затварачем на навој запремине 1,5-2 мл и чувати на -20°C.

Реагенси:

4% раствор NaOH:

- 4g NaOH
- 100 ml дестилате

Растворити NaOH у дестилованој води и мућкати да се раствори. Аутоклавирати 20 минута на 121 степен. Стерилан раствор се може чувати у фрижидеру до 6 мјесеци.

Болница Бијељина	Страна 7 од 13	Издање:	Важи од:	МИ-10-025
		1	2021-09-15	

2,94% раствор натријум цитрата

-2,94g Три натријум-цитрат дихидрата (висока чистоћа)

(C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, MW 294.10) или

-2,6g Три натријум-цитрат анхидрата (C₆H₅Na₃O, MW 258.07)

-дестилована вода 100 ml

Растворити натријум цитрат у дестилованој води. Стерилисати у аутоклаву на 121°C 20 минута. Рок трајања 1 мјесец на 4°.

NALC-NaOH (за 12 узорака)

- 50мл 4% NaOH (стерилан, аутоклавиран раствор),
- 50мл 2,9% Na-цитрат-дихидрата (стерилан, аутоклавиран раствор),
- 0,5g N-ацетил-L-цистеина-непосредно прије употребе раствора додати пажљиво асептичном техником пошто се то више не стерилише.

Припремљени раствор мора се употребити у року од 24 сата, чувати на 4°C.

фосфатни пуфер 0,067 mol/l, pH 6,8:

Раствор А - 9,47g Na₂HPO₄ раствори у 1000 ml дестиловане воде у ерленмајерици,

Раствор Б - 9,07g KH₂PO₄ раствори у 1000 ml дестиловане воде у ерленмајерици.

Помијешати 50 ml раствора А и 50 ml раствора Б. Одредити pH помоћу пехаметра; по потреби за подешавање pH користити 10% фосфорну киселину или 10% NaOH. Разлити фосфатни пуфер у епрувете у количини која одговара запремини епрувете за центрифугирање (нпр. по 50 ml пуфера када се користе епрувете од 50 ml за центрифугирање). Стерилисати у аутоклаву на 121°C током 20 минута, обиљежити и чувати у фрижидеру на +4°C неколико недеља. Након обраде узорака остаци пуфера се могу спојити, аутоклавирати и поново користити.

Поступак

- Ван биосигурносног кабинета обиљежити конусну епрувету за центрифугирање (лабораторијски идентификациони број узорка), предметна стакла и двије епрувете са хранљивом подлогом (лабораторијски идентификациони број узорка, име и презиме, датум засијавања).
- У обиљежену епрувету пипетом сипати до 5 мл испитиваног спутума (висина конусног дијела). Ако је спутум веома вискозан и ако се не може пипетирати, додати у посуду са спутумом исту запремину раствора NALC-NaOH, пажљиво промијешати и потом узорак сипати у епрувету). Маркером означити запремину спутума у епрувети и потом додати исту запремину раствора NALC-NaOH. Добро затворити епрувету.
- Подесити вријеме на тајмеру на 15 минута од момента када је раствор за дигестију и деконтаминацију додат првом узорку. Поставити сталак са епруветама на платформу шејкера, подесити брзину тако да се постигне равномерно мијешање узорка и раствора за обраду (60 до 80 rpm у зависности од модела шејкера). Не мијешати садржај прејак, јер услед велике аерације долази до оксидације NALC-а и његове инактивације.

Болница Бијељина	Страна 8 од 13	Издање:	Важи од:	МИ-10-025
		1	2021-09-15	

- Ако шејкер није доступан, благо вортексирати епрувете (не дуже од 20 секунди) или ручно нежно окретати епрувету горе-доле, без појаве мехурића, у трајању од 20-30 секунди. Оставити епрувете на собној температури (20–25°C) до 15 минута. Поступак вортексирања или ручног окретања епрувета понављати на 5 минута. Проверити да ли је дошло до комплетне ликвефакције узорака. Ако су узорци и даље мукоидни, додати 30-35 mg NALC праха директно у епрувету. Промијешати садржај.
- После 15 минута налити фосфатни пуфер до нивоа који је 2 cm испод врха епрувете (нпр. до ознаке 50 ml на епрувети). Добро промешати садржај (благо вортексирати или ручно извртати епрувете неколико пута).
- центрифугирати 15 минута (3.000x g, на 8 степени).
- После центрифугирања не отварати епрувете 5 минута, колико је потребно да се слегне аеросол у њима. Потом пажљиво одлити супернатант у посуду за одлагање отпадног инфективног материјала.
- седимент пипетом додати 1-2 ml фосфатног пуфера.
- Пипетом засијати по 2-4 капи (0,1-0,2 ml) седимента на двије чврсте хранљиве подлоге и до 0,5 ml на течну подлогу. Већи инокулум може бити и разлог за већи проценат контаминације подлога.
- Направити препарат од једне капи седимента.
- Ако је у узорку за обраду уочљиво присуство крви, треба користити NaOH метод јер NALC нема дејство у присуству крви.

2. Обрада осталих узорака

Гастрични лават

Испитивање гастричног лавата треба спровести што прије, у току 4 сата од узимања, јер постоји могућност уништавања микобактерија због велике киселости желудачног сока. Узорак се узима у епрувету која садржи 100 mg натријум-бикарбоната.

Ако је узорак воденаст, прије деконтаминације центрифугирати га на 3000x током 15 минута, а затим у седимент додати 5мл стерилне дестиловане воде. За обраду узорака гастричног лавата користи се NALC-NaOH или 2-4% NaOH, по истим протоколима који се користе за обраду узорака спутума.

Урин

Цјелокупни урин раздијелити у више епрувета и центрифугирати 15 минута на 3000xg. Опрезно одлити супернатант, ресуспендовати седимент у свакој епрувети са 1-2 мл стерилне воде и скупити седименте у једну епрувету (укупна запремина треба да износи 5 – 10 мл). За обраду седимента урина користи се NALC-NaOH или 2-4% NaOH, по истим протоколима који се користе за обраду узорака спутума.

Брисеви

Брис (ларинкса, рана, фистула, носа, гуше) уронити у епрувету за центрифугирање у којој се налази 2 мл стерилне воде. Да би се могла затворити епрувета за центрифугирање, треба сломити дршку бриса помоћу стерилне пинцете. Додати 2 мл 4% NaOH или NALC-NaOH, затворити епрувету и добро промијешати на вортексу. Оставити на собној температури 15 минута. Пинцетом избацити брис, који је претходно добро исцјеђен притискањем уз зид епрувете. После тога се поступа као код обраде спутума.

Цереброспинални ликвор

Болница Бијељина	Страна 9 од 13	Издање:	Важи од:	МИ-10-025
		1	2021-09-15	

За узорке ликвора не ради се деконтаминација. Ликвор се центрифугира на 3000-3500xг 15 - 20 минутаа затим се добијени седимент засијава на подлогу. Уколико постоји сумња да ликвор није узет асептично и да је контаминиран, урадити деконтаминацију узорка као за спутум.

Гној

Ако је веома густ, гној се обрађује као спутум. За такав поступак потребно је најмање 2 мл гноја. Ако је послато мање или је послат гној на тампону или брису, обрађује се као брис. Ако је волумен узорка већи од 10 мл, обрађује се само 10 мл или се цео узорак прво центрифугира на 3000xг у трајању од 15-20 минута, седимент ресуспендује у 5мл стерилне воде и даље обрађује као спутум.

Ткива

Узорке ткива треба исјецкати помоћу стерилног скалпела на површини предметног стакла, које је смјештено у стерилној петри шољи. На површину стакла преспе се цео садржај посуде са узорком, односно ткиво са стерилним физиолошким раствором. Стерилним скалпелом ситно исјецкати узорак ткива. Затим се предметно стакло испере са 2 до 4 мл фосфатног пуфера. Од садржаја у петри шољи узима се пастеровом пипетом до 5 мл и обрађује 4% NaOH као при обради спутума.

Друге биолошке течности (укључујући и плеуралне пунктате)

- Мукопурулентну течност - обрађивати као спутум ако је волумен узорка до 10 мл.
- Бистра течност – ако је материјал добијен поштовањем правила асепсе, центрифугирати на 3000xг током 15минута И седимент засијати на хранљиву подлогу.

Столица

Стерилним стакленим штапићем узима се мала количина столице и суспендује у 1 мл фосфатног пуфера. Узорак се даље обрађује као спутум.

. Инкубација култура:

Све подлоге треба инкубирати на 35-37°C у термостату до појаве пораста. Негативни резултати култивисања на чврстим подлогама издају се после 8 недеља, а на течним после 6 недеља. Засејане чврсте подлоге треба инкубирати у укошеном положају до недељу дана, да би се обезбиједила уједначена дистрибуција инокулума на косини. Након тога епрувете се могу усправити. Током првих 48 сати затварачи на епруветама треба да буду лабаво затворени, а приликом првог читања пораста треба их чврсто заврнути, да би се смањило сушење подлога.

3. Читање култура

Све засејане подлоге треба прегледати 48 сати након засејавања да би се пронашле могуће контаминирани подлоге. Подлоге чија је комплетна површина контаминирана, као и оне које су омекшале или промјениле боју, треба одбацити. У току раста контаминаната њихови кисели метаболити смањују рН подлоге, при чему се ослобађа малахит зелено и подлога постаје тамнозелена. У овим условима бацил ТБ неће расти. Друго читање култура је седам дана после засијавања, да би се откриле брзорастуће микобактерије. Прегледање култура се затим наставља једном недељно. Прегледањем култура након 3 до 4 недеље обично се уоче позитивне културе *M. tuberculosis*. Тек након 8 недеља од засијавања, ако нема пораста, може се издати негативан резултат култивисања. Течне културе се прегледају свакодневно и издају као негативне после 6 недеља, ако се не користи аутоматизовани систем за течне културе.

4. Идентификација микобактерија

Болница Бијељина	Страна 10 од 13	Издање:	Важи од:	МИ-10-025
		1	2021-09-15	

За прелиминарну идентификацију микобактерија испитују се њихове микроскопске и културелне особине. Колоније *M. tuberculosis* су крем боје, храпаве, воштане, без пигмента и имају изглед карфиола. Обично је потребно 3 до 4 недеље за видљив пораст. *M. bovis* споро расте на чврстим подлогама и формира ситне, беле, округле колоније неравне површине и неправилних ивица.

При прављењу микроскопских препарата са културе, колоније бацила ТБ тешко се скидају са подлоге и лоше емулгују у физиолошком раствору, за разлику од нетуберкулозних микобактерија (NTM) које се лакше емулгују. На микроскопском препарату обојеном по Ziehl-Neelsenу за бацил ТБ типично је груписање у облику завијене ужади („cord“ формација) различите дужине. Међутим, стварање „cord“ формација није својство само бацила ТБ. Неке NTM такође могу формирати „cord“ (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. fallax*, *M. chelonae*). Појединачни бацили дуги су 3-4 μm . На основу претходно описаних карактеристика може да се постави прелиминарна идентификација бацила ТБ. Када се ради конвенционална микобактериолошка дијагностика, за крајњу идентификацију микобактерија треба испитати њихове биохемијске особине - нијацински тест. Не постоји ниједан појединачан тест који ће диференцирати *M. tuberculosis* од осталих микобактерија.

Само за сојеве идентификоване као *M. tuberculosis* ради се тест испитивања осјетљивости на антитуберкулозне лијекове.

Нијацински тест

M. tuberculosis има способност да продукује велику количину нијацина у реакцијама оксидоредукције које се дешавају током метаболичког процеса. Нијацин негативни сојеви *M. tuberculosis* су врло ријетки. Уколико је тест негативан, а остала својства указују на то да се ради о *M. tuberculosis*, нијацински тест треба поновити. Културе млађе од 3 недеље или оне које садрже мали број колонија (мање од 50) нису у могућности да за тако кратко вријеме створе довољно нијацина да би се могло доказати његово присуство. Тест радити комерцијалним реагенсима по упутству произвођача, или на следећи начин:

Поступак

- на културу бактерија налити 1мл стерилне дестиловане воде; ако је пораст конфлуентан, пробости подлогу Пастеровом пипетом да би се омогућио контакт воде са подлогом;
- ставити епрувету хоризонтално, тако да течност прекрије цијелу површину подлоге;
- оставити 60-90 минута за екстракцију нијацина;
- пипетом пренети 0,5мл течног екстракта у епрувету са навојем, оставити да стоји још 30 минута;
- у епрувете постепено додати по 0,2мл 1% калијум цијанида (KCN) и 0,2мл 5% хлорамина;
- реакција се чита након 5 минута, појава жуте боје указује на позитивну реакцију;
- додати 2 до 3мл 4% NaOH и аутоклавирати.

Контроле: реагенсе тестирати екстрактом неинокулисане подлоге (негативна контрола), а као позитивну контролу користити *M. tuberculosis* H37Rv.

Реагенси:

1% KCN (1g KCN + 99мл стерилне дестиловане воде);

Болница Бијељина	Страна 11 од 13	Издање:	Важи од:	МИ-10-025
		1	2021-09-15	

5% хлорамин (5г хлорамина + 95мл стерилне дестиловане воде);

Раствори су нестабилни. Могу се чувати на +4°C до 7 дана.

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Контрола квалитета узорка:

На пријему узорака мора се утврдити квалитет, запремина и број узорака, као и то да ли су узорци одговарајућег типа. Свако одступање се мора забиљежити у лабораторијском извјештају с обзиром да може утицати на резултате микобактериолошког прегледа. Приликом пријема узорака треба пројверити дужину и услове транспорта. Застој у транспорту и/или изложеност узорака екстремним, неоптималним температурама и другим утицајима без предузимања заштитних мјера морају се забиљежити у лабораторијском извјештају.

Контрола квалитета поступка обраде узорака

Контрола квалитета поступка обраде узорака праћењем учесталости контаминације засијаних подлога

Ниједан процес обраде не омогућава убијање цјелокупне пропратне микрофлоре као ни преживљавање свих присутних микобактерија. Стога се сматра да контаминација мањег броја подлога другом флором указује на преживљавање довољног броја микобактерија у току обраде. Дозвољен проценат контаминације на чврстим хранљивим подлогама је 2-5%, а на течним подлогама 5-10%. Већи проценат контаминације подлога може настати услед исувише благе обраде (мања концентрација средстава за деконтаминацију или краћа обрада) или ако је прошло више дана од узимања узорака до обраде. Одсуство контаминације подлога указује на „прејаку“ обраду, у току које су убијени и пратећи микроорганизми и микобактерије, што може бити разлог постојања лажно негативних култура.

Негативна контрола квалитета поступка обраде узорака

Негативна контрола квалитета поступка обраде узорака искључује могућност унакрсне лабораторијске контаминације и издавања лажно позитивних резултата. За негативну контролу поступка обраде треба користити 5 мл фосфатног пуфера уместо узорка. Извршити поступак обраде у складу са описаним протоколом за изабрани метод обраде. Седимент након завршеног поступка обраде треба засејати на L-J подлогу. Засејане подлоге инкубирати на 37°C и пратити пораст у складу са стандардном динамиком праћења пораста микобактерија на L-J подлози. На подлози не би требало да буде пораста. Ако се уочи пораст, растворе коришћене током поступка обраде не треба користити у даљем раду. Анализирати сваку етапу поступка обраде и испитати могућност контаминације коришћених раствора. Негативну контролу поступка обраде треба радити свакодневно или једном недељно заједно са обрадом клиничких узорака. Негативна контрола треба да буде последњи „узорак“ у серији клиничких узорака који се обрађују истовремено.

Позитивна контрола квалитета поступка обраде узорака

За позитивну контролу поступка обраде треба користити лабораторијски сој *M. fortuitum*, који је претходно идентификован молекуларним тестом. Од културе *M. fortuitum* на L-J подлози, која није старија од 7 дана, направити суспензију McFarland 1 у стерилној дестилованој води. Од ове суспензије направити серију десетоструких разблажења до 10⁻⁴ (4,5 мл стерилне дестиловане воде + 0,5 мл одговарајуће суспензије). По 0,1 мл суспензија 10⁻², 10⁻³ и 10⁻⁴ засејати на по једну L-J подлогу. По 1 мл суспензија 10⁻², 10⁻³ и 10⁻⁴ користити као позитивну контролу поступка обраде, односно користити по 1 мл наведених суспензија уместо узорка у поступку обраде. Извршити поступак обраде у складу са описаним протоколом за изабрани метод обраде. По 0,1 мл седимента након завршеног

Болница Бијељина	Страна 12 од 13	Издање:	Важи од:	МИ-10-025
		1	2021-09-15	

поступка обраде треба засијати на L-J подлогу .Све засејане подлоге (суспензије M. fortuitum без поступка обраде и суспензије M. fortuitum након поступка обраде) инкубирати на 37°C и читати резултат пораста након 7 дана инкубирања. Поредити пораст на L-J подлогама на којима су засејане одговарајуће концентрације, односно суспензије истих разблажења без обраде и после обраде. Пораст квантитирати према критеријумима за извјештавање резултата пораста микобактерија на чврстим подлогама наведеним у Табели 6.1. Пораст после обраде треба да буде исти или мањи од пораста суспензија M. fortuitum без обраде, али разлика не смије бити већа од једне категорије. Такав налаз позитивне контроле квалитета обраде указује на оптималну „јачину“ поступка обраде узорака.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ

Није примјењиво.

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

Прелиминарни резултат култивисања треба издати као позитиван, негативан или контаминација. За позитивне културе треба извјестити и о тачном броју колонија и извршити градирање налаза.

Извјештај култивисања

нема пораста	Негативан
1-19 колонија	позитиван – тачан број
20-100 колонија	позитиван 1+
100-200 колонија	позитиван 2+
200-500 колонија, скоро конфлуентан раст	позитиван 3+
>500 колонија, контаминација	позитиван 4+ контаминација

☐ ☐ Ако су културе контаминирани, одмах послати извјештај љекару и тражити нови узорак болесничког материјала.

Болница Бијељина	Страна 13 од 13	Издање:	Важи од:	МИ-10-025
		1	2021-09-15	

Резултат позитивне културе издати одмах као прелиминарни извјештај „Изоловани ацидоалкохолорезистентни бацили. Идентификација у току“. Крајњи извјештај издати након завршене идентификације културе микобактерија.

О порасту микобактерија, које на основу културелних и микроскопских особина одговарају бацилу ТБ, треба одмах извјестити љекара који је послао болеснички материјал у лабораторију. Овај прелиминарни извјештај треба замијенити дефинитивним након идентификације културе до нивоа комплекса/врсте.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Узрок мање осетљивости култивисања могу бити сви поступци који смањују вијабилност микобактерија, као што су дуг транспорт узорак, прејака обрада и неадекватно центрифугирање.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

Текст ТБ лабораторијски водич за микробиолошку дијагностику дијагностику туберкулозе, проф др Бранислава Савић, доц др Драгана Вуковић, Министарство здравља Републике Србије, 2015.

