

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			МИ-10-020
Испитивање хемокултуре и других примарно стерилних течности методом култивације у аутоматизованом систему BACT / ALERT 3D				
Страна 1 од 11	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	2	2023-02-14	др Санда Лазин руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Сврха овог испитивања је детекција и идентификација присутних бактерија и гљивица у узорку, те испитивање њихове осјетљивости на антимикробне лијекове како бисмо примјенили оптималну терапију и рационално користили антибиотике.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Метода се заснива на засијавању узорка у одговарајуће течне подлоге које омогућавају пораст и детекцију очекиваних патогена у тој регији. Сис теми за детекцију микроорганизама BACT / ALERT® користе колориметријски сензор и рефлектовану свјетлост за праћење присуства и производње угљен - диоксида (CO₂) у подлози. Ако су микроорганизми присутни у испитиваном узорку, угљен диоксид се производи током њиховог метаболизма. То доводи до промјене боје сензора на дну бочице из плаво зелене у жуту. Тиме се мијења рефлексија, што апарат прати и снима сваких 10 минута.

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

3.1 Аналитичка осјетљивост BACT / ALERT® FA Plus боце: граница детекције (Limit of Detection - LoD)

Подаци у сљедећој табели представљају резултате интерних студија произвођача. Тестирано је најмање 30 понављања по врсти. Подаци у сљедећој табели су генерисани коришћењем бочица на крају рока трајања. Боце инокулисане са *H. influenzae* обогаћене су са 4ml хумане крви. Најмање 95% детекција је постигнуто у оквиру граница детекције - LoD

Табела 1: Аналитичка осјетљивост: граница детекције Limit of Detection (LoD)

Микроорганизам	Coj ID	LoD (CFU/бочици)
<i>Candida albicans</i>	ATCC 14053	6
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC 12697	5
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12923	4
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 10211	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	STL 104016	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 12924	4
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 14028	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 10788	5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC® 6305™	6

Напомена: 96,7% боца је субкултурисано у року од 30 минута након што су проглашене позитивним. STL 104016 је добијен из б BioMerieux - ове интерне колекције култура.

Болница Бијељина	Страна 2 од 11	Издање:	Важи од:	МИ-10-020
		2	2023-02-14	

3.2 Аналитичка осјетљивост BACT / ALERT® FA Plus боце: перформансе раста

Подаци у следећој табели представљају резултате интерних студија произвођача, са и без додавања крви добијене од здравих добровољаца. Више сојева је тестирано за сваку врсту на циљним нивоима инокулума од 125 CFU / боци. Стварни нивои инокулума су се кретали од 3 -298 CFU / боци. У овој студији са инокулацијом BACT / ALERT® FA Plus боце, субкултуре су рађене најмање 24 сата након што је инструмент означио да су позитивне. Наведене врсте су представници клинички значајних микроорганизама у хемокултурама и стерилним тјелесним течностима.

Табела 2: Аналитичка осјетљивост: перформансе раста

Микроорганизам	Крв				Остали узорци			
	% детекција (n)	Вриједност (CFU/боци)	Вријеме детекције у сатима		%детекција* (n=3)	Вриједност (CFU/боци)	Вријеме детекције у сатима	
			Средња вриједност	Распон			Средња вриједност	Распон
<i>Staphylococcus aureus</i>	100.0 (33/33)	54-150	13.4	12.2-15.6	100.0	116-150	16.7	14.6-18.2
<i>Escherichia coli</i>	100.0 (33/33)	71-254	11.3	10.3-12.4	100.0	73-176	11.4	10.6-11.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100.0 (15/15)	74-148	16.0	13.7-18.6	100.0	74-148	20.8	17.8-25.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100.0 (15/15)	89-123	11.3	10.6-12.3	100.0	95-123	12.0	11.6-12.4
<i>Candida albicans</i>	100.0 (38/38)	88-298	28.9	19.2-52.8	100.0	88-298	27.1	22.1-30.1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100.0 (33/33)	3-260	13.9	10.8-16.5	100.0	4-25	14.3	13.0-16.3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100.0 (15/15)	44-135	17.6	14.3-36.0	100.0	45-105	21.4	19.0-24.8
<i>Enterococcus faecalis</i>	100.0 (15/15)	63-259	11.6	11.0-12.3	100.0	71-169	12.3	11.8-12.7
<i>Enterococcus faecium</i>	100.0 (15/15)	25-120	12.6	11.3-14.4	100.0	25-120	15.5	14.0-17.5
<i>Enterobacter cloacae</i>	100.0 (15/15)	111-200	12.0	10.8-15.7	100.0	111-185	11.7	11.3-12.0
<i>Candida glabrata</i>	100.0 (15/15)	118-281	44.8	27.3-64.8	100.0	118-194	39.9	30.9-50.4
<i>Haemophilus influenzae</i>	100.0 (15/15)	105-266	14.4	12.1-16.8	0	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	100.0 (15/15)	36-213	12.9	11.3-16.3	100.0	36-213	12.5	11.3-13.6

У случају мање -од 100,0% детекције, препоручује се додавање крви као што је стерилна дефибринисана коњска крв (10,0%).

За неке врсте је примјећено мање од 100% детекције, укључујући *Capnocytophaga ochracea*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Granulicatella adiacens*, and *Helicobacter cinaedi*.

3.3 Утицај одложеног транспорта инокулисаних BACT / ALERT® FA Plus бочица до лабораторије на резултате

Болница Бијелина	Страна 3 од 11	Издање:	Важи од:	МИ-10-020
		2	2023-02-14	

Сљедећа табела укључује резултате интерних студија произвођача у којима је засијано 11 врста (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis*), 100 CFU / бочици (прихватљиви опсег од 30 -300 CFU / бочици) који су генерисани на три локације. Стварни нивои инокулаума су се кретали од 35-290 CFU / бочици. Све боце су тестиране крвљу здравих добровољаца и држане су на одређеним температурама и временима прије стављања у BACT / ALERT 3D инструмент. Проценат детекције представља боце сигнализирание као позитивне од стране инструмента, као и субкултуре са морфологијом колоније у складу са засијаним микроорганизмом.

Табела 3: Одложен транспорт до лабораторије

Узорак	Температура чувања (°C)	Дужина транспорта у сатима	% детекције	Вријеме од инокулације до детекције пораста (вријеме транспорта до лаб+ вријеме у апарату до сигнализације позитивности)	
				Средње	Распон
Инокулисане бочице	Контрола	Без одлагања	100.0 (459/459)	14.3	8.5-84.0
	2-8	48	98.6 (292/296)	63.7	57.5-103.2
	20-25	24	98.0 (291/297)	31.8	26.2-74.4
	20-25	36	91.9 (272/296)	41.8	38.0-70.5
	35-37	8	98.9 (454/459)	16.1	10.2-53.8
	35-37	24	56.6 (259/458)	28.3	26.0-74.4
Негативна контрола	Сви услови		0.5 (1/221)*	-	-

* Лажно позитиван узорак (1/221).

3.4 Аналитичка осјетљивост BACT / ALERT® FN Plus боце: граница детекције (Limit of Detection - LoD)

Подаци у сљедећој табели представљају резултате интерних студија произвођача. Тестирано је најмање 30 понављања по врсти. Подаци у сљедећој табели су генерисани коришћењем бочица на крају рока трајања. Бочице су инокулисане са *B. fragilis* и *S. pneumoniae* заједно са 1 ml пуловане хумане крви. Најмање 95% детекције је остварено у LoD - у.

Табела 4: Аналитичка осјетљивост: граница детекције Limit of Detection (LoD)

Микроорганизам	Coj ID	LoD
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC® 25285™	5
<i>Clostridium perfringens</i>	NCTC 8798	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC® 13048™	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC 12697	4
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12923	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 15313™	6
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC® 14028™	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 10788	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC® 6305™	6

Напомена: 86.6% боћица је субкултивисано унутар 30 минута од сигнализирања позитивности

3.5 Аналитичка осјетљивост BACT / ALERT® FN Plus боце: перформансе раста

Болница Бијељина	Страна 4 од 11	Издање:	Важи од:	МИ-10-020
		2	2023-02-14	

Подаци у следећој табели представљају резултате интерних студија произвођача, са и без додавања крви добијене од здравих добровољаца. Више сојева је тестирано за сваку врсту на циљним нивоима инокулума од 125 CFU / боци. Стварни нивои инокулума су се кретали од 3 -299 CFU / боци. У овој студији са инокулацијом BACT / ALERT® FA Plus боце, субкултуре су рађене најмање 24 сата након што је инструмент означио да су позитивне. Наведене врсте су представници клинички значајних микроорганизама у хемокултурама и стерилним тјелесним течностима.

Табела 5: Аналитичка осјетљивост: перформансе раста

Микроорганизам	крв				Остали узорци			
	% детекција (n)	Вриједност CFU/боци	Вријеме детекције у сатима		%детекција * (n=3)	Вриједност CFU/боци	Вријеме детекције у сатима	
			Средња вриједност	Распон			Средња вриједност	Распон
<i>Staphylococcus aureus</i>	100.0 (15/15)	54-150	14.6	12.9-16.7	100.0	116-150	21.8	21.3-22.0
<i>Escherichia coli</i>	100.0 (15/15)	73-254	10.9	10.4-12.4	100.0	73-176	11.6	10.4-12.9
<i>Bacteroides fragilis</i>	100.0 (18/18)	9-154	29.7	24.3-43.6	66.7 (2/3)	19-154	97.2	79.2-115.2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100.0 (15/15)	4-260	16.5	11.5-43.8	100.0	4-25	17.5	16.0-19.3
<i>Clostridium perfringens</i>	100.0 (18/18)	58-210	17.3	12.0-40.1	100.0 (8/8)	76-210	27.1	14.1-35.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100.0 (15/15)	89-123	11.2	10.4-13.1	100.0	95-123	12.6	12.1-13.4
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	70.6 (12/17)	19-204	74.4	36.0-108.0	75.0 (3/4)	19-116	56.1	41.2-64.8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	100.0 (15/15)	14-194	16.9	12.7-28.9	100.0	21-34	25.9	20.5-33.4
<i>Enterococcus faecalis</i>	100.0 (15/15)	63-259	13.7	11.9-19.4	100.0	71-169	22.4	17.8-24.8
<i>Parvimonas micra</i>	80.0 (16/20)	46-154	51.4	37.3-69.6	0.0 (0/4)	46-154	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	100.0 (15/15)	111-200	11.9	11.1-12.5	100.0	111-185	13.0	11.9-14.7
<i>Proteus mirabilis</i>	100.0 (15/15)	36-213	11.4	10.9-12.5	100.0	36-213	11.9	11.5-12.7
<i>Eggerthella lenta</i>	86.7 (13/15)	83-175	41.0	34.8-60.0	66.7 (2/3)	83-151	46.0	44.0-48.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100.0 (15/15)	44-135	21.0	17.4-25.3	100.0	44-105	29.3	24.5-36.8
<i>Listeria monocytogenes</i>	100.0 (15/15)	121-251	17.1	15.5-19.3	100.0	121-251	19.2	17.7-20.3
<i>Clostridium tertium</i>	100.0 (15/15)	24	12.5	11.4-13.5	100.0	24	14.8	14.1-16.0
<i>Clostridium septicum</i>	50.0 (20/40)	25-146	31.7	13.9-62.4	40.0 (2/5)	90-146	43.4	17.1-69.6
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	60.0 (12/20)	49-296	50.9	34.4-79.2	25.0 (1/4)	81-296	44.7	-

У случају мање од 100,0% детекције, препоручује се додавање крви као што је стерилна дефибринисана коњска крв (10,0%).

За неке врсте је примјећено мање од 100% детекције, укључујући *Capnocytophaga ochracea*, *Cardiobacterium hominis*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Granulicatella adiacens*.

3.6 Утицај одложеног транспорта инокулисаних BACT / ALERT® FN Plus боцица до лабораторије на резултате

Сљедећа табела укључује резултате интерних студија произвођача у којима је засијано 6 врста (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Bacteroides fragilis*, and *Clostridium perfringens*), 100 CFU / боцици (прихватљиви опсег од 30 - 300 CFU / боцици) који су генерисани на три локације. Стварни нивои инокулума су се кретали од 41 - 253 CFU / боцици. Све боце су тестиране крвљу здравих добровољаца и држане су на одређеним температурама и временима прије стављања у BACT / ALERT 3D инструмент.

Болница Бијелина	Страна 5 од 11	Издање:	Важи од:	МИ-10-020
		2	2023-02-14	

Table 6: Одложен транспорт до лабораторије

Узорак	Температура чувања (°C)	Дужина транспорта у сатима	% детекције	Вријеме од инокулације до детекције пораста (вријеме транспорта до лаб+ вријеме у апарату до сигнализације позитивности)	
				Средње	Распон
Инокулисане бочице	Control	No delay	100.0 (89/89)	15.9	9.5-52.8
	2-8	48	100.0 (65/65)	63.3	50.1-90.4
	20-25	24	100.0 (62/62)	34.7	26.0-79.2
	20-25	36	100.0 (62/62)	43.6	38.0-78.6
	35-37	8	100.0 (72/72)	17.7	10.0-53.4
	35-37	24	80.0 (64/80)	28.6	26.0-52.3
Негативна контрола	У свим условима		0.0 (0/51)	-	-

Напомена: Инокулисане бочице које су прије убацивања у апарат биле инкубиране на 35-37°C 24 часа и дуже, требају бити субкултивисане јер можда апарат неће детектовати пораст.

3.7 Аналитичка осјетљивост BACT / ALERT® PF Plus боце: граница детекције (Limit of Detection - LoD)

Подаци у сљедећој табели представљају резултате интерних студија произвођача. Тестирано је најмање 30 понављања по врсти. Подаци у сљедећој табели су генерисани коришћењем бочица на крају рока трајања. Боце инокулисане са *H. influenzae* обогачене су са 4ml хумане крви. Најмање 95% детекција је постигнуто у оквиру граница детекције - LoD

Табела 7: Аналитичка осјетљивост: граница детекције Limit of Detection (LoD)

Микроорганизам	Coj ID	LoD (CFU/боци)
<i>Candida albicans</i>	ATCC® 14053	6
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC® 13048	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC 12697	5
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12923	4
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC® 10211	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	STL 104016	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 15313	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 12924	4
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC® 14028	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 10788	5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC® 6305	6

Напомена: 96,7% боца је субкултурисано у року од 30 минута након што су проглашене позитивним. STL 104016 је добијен из б BioMérieux -ове интерне колекције култура

3.8 Аналитичка осјетљивост BACT / ALERT® PF Plus боце: перформансе раста

Подаци у сљедећој табели представљају резултате интерних студија произвођача, са и без додавања крви добијене од здравих добровољаца. Више сојева је тестирано за сваку врсту на циљним нивоима инокулума од 125 CFU / боци. Стварни нивои инокулума су се кретали од 3 -298 CFU / боци. У овој студији са инокулацијом BACT / ALERT® FA Plus боце, субкултуре су рађене најмање 24 сата након што је инструмент означио да су позитивне. Наведене врсте

Болница Бијелина	Страна 6 од 11	Издање:	Важи од:	МИ-10-020
		2	2023-02-14	

су представници клинички значајних микроорганизама у хемокултурама и стерилним тјелесним течностима

Табела 8: Аналитичка осјетљивост: перформансе раста

Микроорганизам	Крв			
	% детекције (n)	Распон CFU/бочици	Вријеме детекције у сатима	
			Средња вриједност	Распон
<i>Staphylococcus aureus</i>	100.0 (30/30)	54-150	13.3	12.2-15.2
<i>Escherichia coli</i>	100.0 (30/30)	71-254	11.2	10.3-11.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100.0 (12/12)	74-148	15.7	13.7-17.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100.0 (12/12)	89-123	11.3	10.6-12.3
<i>Candida albicans</i>	100.0 (30/30)	88-298	29.0	19.2-52.8
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100.0 (30/30)	3-260	13.8	10.8-16.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100.0 (12/12)	44-135	17.6	14.3-18.8
<i>Enterococcus faecalis</i>	100.0 (12/12)	63-259	11.6	11.0-12.2
<i>Enterococcus faecium</i>	100.0 (12/12)	25-120	12.8	11.3-14.4
<i>Enterobacter cloacae</i>	100.0 (12/12)	111-200	11.6	10.8-12.5
<i>Candida glabrata</i>	100.0 (12/12)	118-281	43.5	27.3-64.8
<i>Haemophilus influenzae</i>	100.0 (12/12)	105-266	14.4	12.0-16.8
<i>Proteus mirabilis</i>	100.0 (12/12)	36-213	12.5	11.3-14.6

За неке врсте је примјечено мање од 100% детекције, укључујући *Capnocytophaga ochracea*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Granulicatella adiacens*, and *Helicobacter cinaed*

3.9 Утицај одложеног транспорта инокулисаних BACT / ALERT® PF Plus бочица до лабораторије на резултате

Сљедећа табела укључује резултате интерних студија произвођача у којима је засијано 11 врста (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitides*), 100 CFU / бочици (прихватљиви опсег од 30 -300 CFU / бочици) који су генерисани на три локације. Стварни нивои инокулама су се кретали од 35 - 290 CFU / бочици, па и више од 300 CFU / бочици. Све боце су тестиране крвљу здравих добровољаца и држане су на одређеним температурама и временима прије стављања у BACT / ALERT 3D инструмент. Проценат детекције представља боце сигнализирание као позитивне од стране инструмента, као и субкултуре са морфологијом колоније у складу са засијаним микроорганизмом.

Табела 9: Одложен транспорт до лабораторије

Узорак	Температура чувања (°C)	Дужина транспорта у сатима)	% детекције	Вријеме од инокулације до детекције пораста (вријеме транспорта до лаб+ вријеме у апарату до сигнализације позитивности)		Инокулум (CFU/бочици)
				Средња вриједност	Распон	
Инокулисане бочице	контрола	Без одлагања	100.0 (459/459)	14.3	8.5-84.0	35-288
	2-8	48	98.6 (292/296)	63.7	57.5-103.2	48-288
	20-25	24	98.0 (291/297)	31.8	26.2-74.4	50-288

Болница Бијељина	Страна 7 од 11	Издање:	Важи од:	МИ-10-020
		2	2023-02-14	

	20-25	36	91.9 (272/296)	41.8	38.0-70.5	50-290
	35-37	8	98.9 (454/459)	16.1	10.2-53.8	35-288
	35-37	24	56.6 (259/458)	28.3	26.0-74.4	35-288
Негативна контрола	У свим условима		0.5 (1/221)*	-	-	-

* Један лажно позитиван узорак је детектован. Негативност потврђена препаратом и субкултуром.
Напомена: Инокулисане бочице које су прије убацивања у апарат биле инкубиране на 35-37°C 24 часа и дуже, требају бити субкултивисане јер можда апарат неће детектовати пораст.

4. ВРСТА УЗОРКА

Крв и остале примарно стерилне течности (плеурална, перикардна, синовијална, ликвор...).

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: BioMerieux BACT / ALERT® подлоге за хемокултуру, Крвни агар, Ендо агар, глукозни бујон, *Müller Hinton* подлога, антибиограм таблете, физиолошки раствор, подлоге за биохемијску серију, аглутинарајући серуми за идентификацију стрептокока, картице за ВИТЕК 2 апарат, раствор метиленско плаво, реагенси за бојење по Граму, ескулин, плазма, таблете (новобеоцин, оксидаза, бацитрацин), гас пак системи.

Апарати: BACT / ALERT 3D, фрижидер, инкубатор, вортекс, дензитометар, микроскоп, ВИТЕК 2, плинска боца са пламеником, лонац за анеробну култивацију.

BACT / ALERT 3D течне подлоге су спремне за употребу. Чувати их у усправном положају заштићено од директне свјетлости на собној температури (15-30°C). Датум истека је одштампан на свакој етикети боце. Немојте користити боце након истека рока трајања. Ако су боце изложене температурама нижим од 15°C, може доћи до стварања талоба који ће нестати када се боце загрију на собну температуру. Боце морају бити на собној температури прије употребе.

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Управљање условима средине и безбједношћу дефинисано је у даљем тексту, као и сљедећим документима:

УП-10-142: Мјере заштите на раду у Служби за микробиологију са паразитологијом,

УП-10-023: Употреба средстава личне заштите у Служби за микробиологију са паразитологијом,

УП-10-139: Упутство за безбједно руковање опасним хемикалијама у Служби за микробиологију са паразитологијом,

УП-10-141: Прање и стерилизација лабораторијског посуђа у Служби за микробиологију са паразитологијом,

УП-10-138: Обезбјеђење и прањење услова средине у току испитивања,

Болница Бијељина	Страна 8 од 11	Издање:	Важи од:	МИ-10-020
		2	2023-02-14	

УП-10-041: Упутство у случају лабораторијског акцидента у Служби за микробиологију са паразитологијом.

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Није примјењиво.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

Обрада узорка: Узорак се засијава у комерцијалне готове течне подлоге: посебне за изолацију аеробних бактерија, анаеробних бактерија и педијатријске за дјecu. Инокулисане бочице одмах донијети у лабораторију и ставити у у апарат. Уколико то није могуће, чувати их на собној температури, 15-30°C, према препоруци произвођача до 24 часа. У лабораторији, при пријему инокулисаних бочица, неопходно је детаљно визуелно прегледати бочицу како бисмо уочили знакове пораста микроорганизама (замућеност, индикатор жуто обојен, присуство гаса). Ово је нарочито значајно уколико је био одложен транспорт до лабораторије или је бочица била у инкубатору. Уколико постоје наведени знакови пораста, неопходно је одмах обавијестити надлежног микробиолога. Такве бочице се не смију ставити у BACT / ALERT 3D апарат. Направити Грам препарат и субкултивисати. Уколико је препарат негативан, микробиолог ће одлучити да ли бочицу ставити у апарат. Бочице код којих је препарат позитиван ни у ком случају не смију бити стављене у BACT / ALERT 3D.

Напомена: BioMerieux BACT / ALERT боце за културу које се користе за култивацију узорака који нису крви (обично стерилне тјелесне течности) или веома мале запремине узорака крви (0,5ml или мање) захтијеваће додатну крв као што је стерилна дефибринисана коњска / хумана крв (10,0% од волумена подлоге) да подржи раст, посебно за раст и детекцију изабирљивих организама као што су *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria gonorrhoeae*.

Култивација се врши у BACT / ALERT 3D апарату.

Из бочица за аеробну култивацију које је Bact / Alert сигнализирало као позитивну, направити Грам препарат и пресијати на :

- крвни агар / Колумбија агар, направити разрјеђење. Кроз разрјеђени дио повући стафилококну црту. Инкубирати на 35°C±2°C, аеробно, 18 - 48 часова,
- чоколадни агар , 5 - 10% CO₂, 35°C±2°C , 40 - 48 часова,
- Ендо агар / MacConkey - аеробно, на 35±2°C, 18 - 24 часа.

Из бочица за анаеробну култивацију које је Bact / Alert сигнализирало као позитивну, направити Грам препарат и пресијати на:

- крвни агар / Колумбија агар (ев. додати диск 5µg метронидазола на примарни потез). Инкубација анаеробно, у боксу са генератором анаеробне средине, 35°C±2°C, 2 до 5 дана.

Уколико је препарат негативан код бочица које су сигнализирале као позитивне, вратити је у апарат до пораста субкултуре / позитивности / истека рока од 5 дана.

Порасле колоније идентификујемо (препарат, биохемијске особине, аутоматизовано - Витек) и вршимо испитивање осјетљивости на антибиотике (ДДМ или Витек). Уобичајено, негативан налаз издајемо након 5 дана инкубације, те вадимо бочице из апарата и одбацујемо их у складу са важећим процедурама збрињавања инфективног отпада. Постоји пракса гледања препарата из свих негативних бочица по истеку 5 дана инкубације, прије издавања негативнг налаза.

Болница Бијељина	Страна 9 од 11	Издање:	Важи од:	МИ-10-020
		2	2023-02-14	

Нарочиту пажњу посветити пресијавању и припреми микроскопских препарата из позитивних бочица, оне могу бити под притиском због велике количине гаса услед пораста микроорганизама. Радити обавезно у биосигурносном кабинету, потребно је пажљиво вентилирати боцу прије узимања материјала.

Поступак стављања и вађења бочица из BACT / ALERT 3D **апарата** спроводити у складу са упутством произвођача.

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Све бочице са подлогама за BACT / ALERT 3D посједују сертификат о усаглашености. У склопу апарата BACT / ALERT 3D постоји кит калибрационих стандарда за калибрацију уређаја, према упутству произвођача. 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 у фрижидера у којима се чувају реагенси.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ

Спроведене су студије са цереброспиналном течношћу, плеуралном течношћу, синовијалном течношћу, плазмом, крвљу и крвним угрушцима. Сваком од ових узорака такође су додати леукоцити у концентрацијама релевантним за бактеријемiju, односно инфекцију у свакој од тих течности. Тестирање је спроведено са и без микроорганизама. Није евидентирано ометање у детекцији присутних микроорганизама, нити лажно позитивни резултати у одсуству микроорганизама.

Уколико је пацијент под антибиотском терапијом постоји могућност лажно негативног резултата.

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.

Болница Бијељина	Страна 10 од 11	Издање:	Важи од:	МИ-10-020
		2	2023-02-14	

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

Извјештава се било који изоловани организам уз коментар о клиничком значају када постоји сумња. Пораст на подлози се одмах телефонски јавља надлежном клиничару.

Сумња у клинички значај изолата постоји када су изоловани различити микроорганизми у парном узорку хемокултуре, када се у напомени сугерише клиничарима да понове анализу.

Кад се из једне хемокултуре изолују 2 или више бактеријских врста које су микрофлора коже, препоручује се понављање анализе уз назнаку да је хемокултура контаминирана.

У случају негативног налаза, односно одсуства пораста на подлогама извјестити: Засијане подлоге су остале стерилне, уз евентуалну напомену колико дана је трајала инкубација.

Ограничења методе

1. Узорци пацијената за које је BACT / ALERT 3D утврдио да су позитивни могу садржати организме који су позитивни на основу размаза који неће расти на рутинској субкултури. Када се сумња на то, треба субкултурисати на посебним подлогама. Такође, BACT / ALERT 3D позитивни узорци могу садржати организме који се не виде рутинским методама бојења размаза и могу захтијевати и специјално бојење и субкултуру за откривање.
2. Могуће је да одређени ријетки, избирљиви микроорганизми неће расти или ће расти споро у медијуму за раст у бочици за културу BACT / ALERT 3D FA Plus. Поред тога, у ријетким случајевима, могу се срести микроорганизми који расту у медијуму за раст у бочици за културу BACT / ALERT 3D FA Plus, али не производе довољно угљен - диоксида да би се утврдило да је позитиван. Ако се сумња на ретке, избирљиве организме који захтијевају специјалне подлоге и услове културе, треба размотрити алтернативне методе или продужено вријеме инкубације.
3. Одређени сојеви *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Neisseria meningitidis*, *Peptostreptococcus spp.* могу бити осјетљиви на антикоагуланс СПС, што може резултирати недостатком раста или ниском производњом CO₂ од стране ових сојева ако се недовољна количина узорка инокулише у боце за културу.
4. Ријетко, ако је у узорку присутан веома велики број бијелих крвних зрнаца, BACT / ALERT 3D може да сигнализира на позитивност. У овом случају, резултати размаза и субкултуре могу бити негативни.
5. Микроорганизми су често малобројни и могу се повремено појављивати у крвотоку; стога треба узети узастопне узорке крви од сваког пацијента.
6. Одмах уклонити и субкултивисати бочице са позитивним културама када их BACT / ALERT сигнализира да бисмо избјегли аутолизу неких култура и немогућност откривања (*Streptococcus pneumoniae*).
7. Размаз обојен по Граму из негативне боце понекад може садржати мали број неживих организама који су добијени од компоненти медијума за културу, реагенса за бојење, уља за потапање или стаклених плочица, што доводи до лажно позитивног размаза.
8. BioMerieux препоручује да се боце са инокулисаним културама ставе у BACT / ALERT систем за детекцију микроба што је прије могуће након сакупљања. Али, у неизбјежним случајевима, информације о одложеном приспјећу у лабораторију су дате у одјелку Карактеристике перформанси.
9. Антимикробна неутрализација није постигнута за цефтазидим или цефепим.

Болница Бијељина	Страна 11 од 11	Издање:	Важи од:	МИ-10-020
		2	2023-02-14	

10. Продужено вријеме до откривања или негативни резултати могу се примјетити за *Stenotrophomonas maltophilia* у цереброспиналној течности за бочице старе 12 мјесеци.

11. BACT / ALERT 3D FA Plus боца за културу нема одговарајуће нивое CO₂ да би поуздано подржао раст капнофила као што је *Capnocytophaga* spp.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Уколико је пацијент под антимикуробном терапијом постоји могућност лажно негативног резултата.

Препоруке су да се у код пацијената који примају антибиотике / антимикуботике узорак за хемокултуру узме непосредно прије давања сљедеће дозе антибиотика. На тај начин се омогућава оптимално дејство супстанци које се налазе у подлози како би неутралисали евентуално присутне антимикуробне лијекове у узорку.

У подлогама за BACT / ALERT® 3D постиже се неутрализација антимикуробних лијекова из сљедећих категорија: пеницилини, полиени, макролиди, триазоли, ехинокандини, аминокликозиди, хинолони, линкозамиди, гликопептиди и оксазолидинони. Нешто слабија могућност неутрализације је код цефалоспорина (цефтазидим, цефепим).

20. РЕФЕРЕНЦЕ

Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology, Koneman E.W., Philadelphia 2016.

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

BioMerieux BACT / ALERT® 3D упутство произвођача.

BioMerieux BACT / ALERT® FA Plus упутство произвођача.

BioMerieux BACT / ALERT® FN Plus упутство произвођача.

