

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			МИ-10-010
Припрема и бојење препарата спутума на ААРБ (Ziehl-Neelsen)				
Страна 1 од 7	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	2	2023-07-24	др Санда Лазић руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Припрема и бојење препарата спутума на ААРБ (Ziehl – Neelsen) како би се видјело присуство ацидоалкохолорезистентних бацила.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Микобактерије су ацидоалкохолорезистентне бактерије, јер се не могу одбојити раствором киселине и алкохола. Микобактерије се као ацидоалкохолорезистентни бацили (АРБ) боје карбол фуксином црвено, а остали микроорганизми плаво, ако је контрастна боја метилен плаво.

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

Налаз ацидоалкохолорезистентних бацила (АРБ) на директном препарату је најбржи и најјефтинији метод за детекцију микобактерија. На основу овог метода не може се извршити идентификација микобактерија на нивоу врсте и за позитиван налаз неопходно је присуство великог броја бацила у болесничком материјалу (>10.000 бацила / мл материјала), те је према томе, овај метод неспецифичан и ниско осјетљив. Микобактерије нису једини ацидоалкохолорезистентни микроорганизми. Родови *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* и *Gordona* су дјелимично ацидоалкохолорезистентни, односно одбојавају се раствором киселине којим се у процедури бојења микобактерије не могу одбојити, али се не одбојавају ако се користи раствор киселине ниже концентрације. Ацидоалкохолорезистентне су и ооците родова *Cryptosporidium* и *Isospora*.

4. ВРСТА УЗОРКА

Спутум.

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: Сет боја за Ziehl - Neelsen бојење класично са загријавањем или хладно

Садржај комплекта COLD ZN (RAL) за хладно бојење:

Фиксатив 1x240 ml

Фуксин 1x240 ml

Течност за обезбојавање 1x240 ml

Метиленско плаво 1x240 ml

Комплет омогућава бојење од 100 до 150 препарата. Вријеме обраде: 18 мин и 30 сек.

Болница Бијељина	Страна 2 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-010
		2	2023-07-24	

Чување кита: 15-25 ° Ц, далеко од свјетлости.

Апарати: Фрижидер, центрифуга, микроскоп, плинска боца са пламеником.

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*, 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: *Безбиједно 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.

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Није примјењиво.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

Обрада узорка: **Процедура припремања препарата за ацидорезистентно бојење**

- За препарате користити нова предметна стакла која морају бити чиста и без огреботина.
- Предметно стакло обиљежити на једном крају редним бројем из лабораторијског протокола и то на мат површину графитном оловком.
- Ако се препарат прави од необрађеног спутума, ПВЦ езом или дрвеним штапићем се узимају најгушћи дијелови спутума који су пурулентног изгледа или у којима има крви. Дрвени штапић се претходно преломи и храпавом површином на мјесту прелома лакше се захвате густе дијелови спутума.
- На центру предметног стакла направити равномјеран размаз површине 1x2 cm, понављањем кружних покрета све док се не изгубе све честице велике густине. Дебљина размаза треба да је таква да се кроз њега може читати текст. Сувише дебели препарати могу маскирати присуство ААРБ, а могу да се и сљухте са плочице током рада.
- ***након прављења размаза дезинфикујте радну површину***
- Металну езу прије спаљивања на пламену треба очистити од остатака узорка, тако што се више пута зарони у посуду са пијеском и алкохолом и након тога спалити до усијања на пламенику.
- Размаз сушити на ваздуху.
- Фиксирати размаз на пламену тако што се три пута провлачи кроз пламен, држећи стакло пинцетом, при чему је размаз окренут на горе, а свако провлачење кроз пламен траје 1 - 2 секунде. Водити рачуна да се препарат не прегреје у току фиксирања. Пинцетом не хватати за дио плочице на ком је размаз. Пошто се размаз охлади може се бојити.
- Препарате ставити на метални држач. Предметна стакла се не смију додиривати. Истовремено не треба бојити више од 12 препарата.

Болница Бијељина	Страна 3 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-010
		2	2023-07-24	

БОЈЕЊЕ СА ЗАГРИЈАВАЊЕМ

- Препарат у потпуности прелити карбол фуксином. Ако боја није претходно филтрирана на сваки препарат поставити филтер папир, величине предметног стакла и потом прелити карбол фуксином.
- Са доње стране загријевати плочице помоћу пламена. Престати са загријевањем када се појави пара. Поновити загријевање пет пута. Боја не смије да прокључа. Долити боју ако је испарила у току загријевања.
- Трајање бојења је **10 минута**.
- Свако стакло подићи пинцетом да се одлије вишак боје, водећи рачуна да не капне на други препарат.
- Испрати плочице водом (из мензуре, не директно из чесме).
- Прелити препарате раствором за одбојавање који треба да стоји **3 минута**.
- Препарате добро испрати водом. Одлити вишак воде са препарата.
- Прелити препарате метилен плавим. Оставити боју да стоји **1 минут**.
- Испрати препарате водом. Одлити вишак воде са препарата.
- Препарати се суше на ваздуху у усправном положају. Не сушити их брисањем филтер папиром, јер се тако може уклонити и размаз са плочице.

ХЛАДНО БОЈЕЊЕ - KIT COLD ZN (RAL) - ПОСТУПАК БОЈЕЊА

- Ставити плочицу са фиксираним узорком на постоље за бојење
- Прелити стакалце фиксативом током **1 минута**.
- Одлити боју и испрати са водом током 30 секунди.
- прелити препарат фуксином током **10 минута**.
- Одлити боју и испрати са водом током **1 минута**.
- Прелити препарат раствором за обезбојавање током 3 минута.
- Одлити боју и испрати са водом током **1 минута**.
- Прелити препарат метиленским плавим током **1 минута**.
- Одлити боју и испрати са водом током 1 минута и оставити да се осуши
- Микроскопирати имерзионо, увећање 100 х

Напомена: Сходно дебљини препарата, можда је потребно продужити трајање бојења фуксином.

Напомена: Обојени размаз мора бити свијетлоплав. Тамноплав значи да је размаз прегуст или да је бојење метилен плавим предуго трајало, те ће црвени АРБ бацили остати сакривени (лажно негативан налаз).

При раду водити рачуна да се приликом сипања боје не додирне површина препарата и да не пршће на сусједне плочице. Пинцетом не хватати за дио плочице на ком је размаз.

Процедура прегледа обојеног микроскопског препарата

- Микроскопирање почети прегледом познатог позитивног и негативног директног контролног препарата.

Болница Бијељина	Страна 4 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-010
		2	2023-07-24	

- На препарат обојен карбол фуксином сипати кап имерзионог уља, водећи рачуна да се не додирује препарат капаљком за уље, како би се избјегла контаминација уља са АРБ и појава лажно позитивних налаза.
- Посматрати под имерзијом. Прегледати најмање 100 видних поља прије издавања негативног резултата. Ако је велики број АРБ на препарату, довољно је прегледати мањи број видних поља.
- Уписати резултат микроскопског прегледа. Окренути објектив, скинути препарат и ставити га на апсорбујући папир, тако да је страна са размазом на папиру. Овај поступак служи томе да папир упије имерзионо уље. Оставити до краја радног дана или до следећег јутра. Током стајања не померати препарат. Друга могућност је остављање препарата у вертикалном положају да се слије имерзионо уље.
- Чувати препарате за спољашњу контролу у кутији према редном броју, без писања резултата микроскопије на препарату.
- Папиром за брисање сочива обрисати имерزيونи објектив прије прегледа следећег препарата.
- На крају сваког микроскопирања очистити објектив 70% етанолом или раствором етра и алкохола у односу 80% и 20%. За чишћење користити фини папир за брисање сочива.
- Најчешћи проблеми приликом микроскопирања, могући разлози за те проблеме и предлози рјешења приказани су у Табели 1.

Табела 1: Проблеми приликом микроскопирања

Мрачно видно поље	Ниско постављен кондензор. Затворена дијафрагма кондензора	Подићи кондензор. Отворити дијафрагму
Тамне мрље у видном пољу које се помјерају са окретањем окулара	Прљав окулар Огребана површина	Очистити окулар. Замијенити окулар.
Нејасна слика под имерзијом	Мјехурићи ваздуха у имерзионом уљу. Сувише густо, љепљиво	Окренути плочицу Брзо помјерити препарат Лијево - десно. Узети уље мање вискозности (или препоручено имерзионо уље).
Видно поље је и даље мутно и замагљено	Прљавштина на објективу Пенетрација уља између сочива објектива Оштећење објектива (немарно руковање, грубо фокусирање, мијењање препарата).	Очистити сочива. Замјена објектива. Замјена објектива

Болница Бијељина	Страна 5 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-010
		2	2023-07-24	

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

За сваку нову серију комерцијалних боја или боја припремљених у лабораторији, као и приликом сваког поступка бојења клиничких узорака треба извршити контролу квалитета коришћених реагенса. Као позитивну контролу треба користити културу *M. tuberculosis* H37Ra, уколико је доступна (или неки „in house“ сој *M. tuberculosis*), а као негативну контролу културу *Escherichia coli* или доказано негативан узорак спутума. Препорука је да се направи већи број размаза позитивних и негативних контролних препарата, да се размази фиксирају и да се затим чувају необојени у затвореној кутији заштићени од свјетлости и влаге. Контролне препарате треба бојити у оквиру редовног поступка бојења у лабораторији, заједно са бојењем узорака. На позитивном контролном препарату треба да се уочавају јасно црвено обојени АРБ, а на негативном контролном препарату плаво обојени бацили *E. coli* и одсуство АРБ. Ако су АРБ на позитивном контролном препарату недовољно интензивно обојени или ако се уочавају преципитати боје, квалитет боје није одговарајући. Посебно важан налаз на негативном контролном препарату јесте уочавање присуства АРБ. Овакав налаз указује на контаминацију неког од коришћених реагенса. Евиденције интерне контроле *Ziehl-Neelsen* бојења се врши на обрасцу ОБ-10-337: Евиденција интерне контроле ZIEHL-NEESEN бојења.

За унапређење квалитета микроскопског прегледа директних препарата важна препорука је да микроскопирање директних препарата клиничких узорака увијек треба почети прегледом познатог позитивног и негативног директног контролног препарата. Лабораторија треба да припреми колекцију ових препарата из микроскопски позитивних и микроскопски негативних узорака спутума. Ови контролни препарати се чувају као обојени и користе више пута.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ

Описано под тачком 19.

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

Микроскопским прегледом препарата треба да се утврди да ли су присутни ААРБ и да се процјени њихов приближан број по посматраном видном пољу. Треба прегледати најмање 100 поља. Резултат микроскопског прегледа треба издати што прије. Микроскопски налаз треба да садржи следеће информације:

- оцјену квалитета узорка спутума,
- метода бојења,
- просечан број АРБ на препарату,

Болница Бијељина	Страна 6 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-010
		2	2023-07-24	

— датум прегледа и потпис микроскописте.

Негативан препарат

Означити метод бојења. Налаз "АРБ нису присутни".

Позитиван препарат

Означити метод бојења препарата. Резултат прегледа препарата мора бити квантитативан. За препарате обојене по *Зиел-Неелсен*-у препоручује се следећа шема за извјештавање микроскопског налаза.

Табела 2: Квантитативно читавање код позитивног налаза ацидорезистентних бацила

Број ацидорезистентних бацила (АРБ)	Поља	Извјештај
Нема ААРБ	100 видних поља	Нису виђени ацидорезистентни бацили (Нема ААРБ на 100 видних поља)
1-9 ААРБ	100 видних поља	уписати тачан број (1-9 ААРБ на 100 поља)
10-99 ААРБ	100 видних поља	1+ (10-99 ААРБ на 100 поља)
1-10 ААРБ	на једном пољу	2+ (1-10 ААРБ по пољу у 50 поља)
>10 ААРБ	на једном пољу	3+ (више од 10 ААРБ по пољу на 20 поља)

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Табела 3: Најчешћи узроци лажно негативних резултата директне микроскопије

Дебео размаз или прљаве плочице, материјал се одлепљује/спира током бојења	Правилна дигестија узорка Смањити количину материјала који се наноси на плочицу
Танак размаз, сувише велика површина размаза	Површина размаза треба да буде 1-2×2-3 цм; повећати количину нанијетог материјала
Необојени или слабо обојени бацили	Одлити вишак воде при испирању препарата како се не би разблаживала боја Узети нове реагенсе
Неодговарајућа температура приликом фиксације размаза	Фиксирати препарат на пламену
Непажљиво и брзо микроскопирање	Униформно микроскопирање Прегледати препоручени број

Болница Бијељина	Страна 7 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-010
		2	2023-07-24	

	микроскопских поља
--	-----------------------

Табела 4. Најчешћи узроци издавања лажно позитивних резултата директне микроскопије

Старе, коришћене микроскопске плочице	Користити искључиво нове плочице
Унакрсна контаминација (бацили пренети са позитивног на негативан препарат)	Бојење на држачима (никад у посудама за бојење) Размак између препарата
Остаци хране из спутума	Тражити други узорак
Исталожена боја	Користити само свјеже растворе боја (без преципитата); провјерити воду и боје на контаминанте; филтрација боје
Преношење бацила преко уља на имерзионом објективу или контаминација имерзионог уља	После сваког позитивног препарата обрисати сочиво имерзионог објектива; наносити уље без додиривања размаза; замјенити бочицу са уљем, када постоје знаци контаминације

20. РЕФЕРЕНЦЕ

Текст ТБ лабораторијски водич за микробиолошку дијагностику туберкулозе, проф др Бранислава Савић, доц др Драгана Вуковић, Министарство здравља Републике Србије, 2009. год.