



Република Србија
МИНИСТАРСТВО ЗДРАВЉА



Пројекат
"Контрола туберкулозе у Србији"

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ
ФАКУЛТЕТ



ВОДИЧ ЗА МИКРОБИОЛОШКУ ДИЈАГНОСТИКУ ТУБЕРКУЛОЗЕ



Београд, 2015.



Република Србија
МИНИСТАРСТВО ЗДРАВЉА



Пројекат
"Контрола туберкулозе у Србији"

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ
ФАКУЛТЕТ



Пројекат КОНТРОЛА ТУБЕРКУЛОЗЕ У СРБИЈИ

ВОДИЧ ЗА МИКРОБИОЛОШКУ ДИЈАГНОСТИКУ ТУБЕРКУЛОЗЕ

Београд, 2015.

„Водич за микробиолошку дијагностику туберкулозе“ је припремљен и штампан у оквиру реализације пројекта Министарства здравља Републике Србије **“Контрола туберкулозе у Србији”**, за који је финансијска средства обезбедио Глобални фонд за борбу против AIDSa, туберкулозе и маларије.

АУТОРИ

Проф. др Бранислава Савић,
Медицински факултет, Универзитет у Београду

Проф. др Драгана Вуковић,
Медицински факултет, Универзитет у Београду

Проф. др Ивана Дакић,
Медицински факултет, Универзитет у Београду

Асист. др Ирена Аранђеловић,
Медицински факултет, Универзитет у Београду

САДРЖАЈ

ПРЕДГОВОР	7
Предговор првом издању	7
Предговор другом издању	7
Предговор трећем издању	8
1. УВОД	9
1.1. Организација лабораторијске службе за дијагностику туберкулозе	10
1.2. Задаци националне референтне лабораторије за туберкулозу	12
2. УЗИМАЊЕ И ТРАНСПОРТ УЗОРАКА ЗА МИКОБАКТЕРИОЛОШКИ ПРЕГЛЕД	15
2.1. Основни принципи правилног узимања узорака	15
2.2. Специфични принципи за правилно узимање узорака	16
2.3. Транспорт узорака	21
2.4. Пријем узорака	23
2.5. Контрола квалитета узорака и услова транспорта	25
3. ОБРАДА УЗОРАКА ЗА МИКОБАКТЕРИОЛОШКУ ДИЈАГНОСТИКУ	27
3.1. Обрада спутума	29
3.2. Обрада осталих узорака	35
3.3. Контрола квалитета поступка обраде узорака	37
4. БОЈЕЊЕ И МИКРОСКОПСКИ ПРЕГЛЕД ПРЕПАРАТА У МИКОБАКТЕРИОЛОШКОЈ ДИЈАГНОСТИЦИ	41
4.1. Прављење препарата	41
4.2. Бојење препарата по Ziehl-Neelsenu	42
4.3. Бојење препарата флуоресцентним бојама	45
4.4. Микроскопија	48
4.5. Издавање резултата микроскопије	50
4.6. Контрола квалитета бојења по Ziehl-Neelsenu	54

5. ИЗОЛАЦИЈА И ИДЕНТИФИКАЦИЈА МИКОБАКТЕРИЈА	55
5.1. Хранљиве подлоге	55
5.2. Засејавање хранљивих подлога	60
5.3. Читање култура	61
5.4. Идентификација микобактерија	62
5.5. Издавање резултата култивисања	68
6. ИСПИТИВАЊЕ ОСЕТЉИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЈА НА АНТИТУБЕРКУЛОТИКЕ	69
6.1. Припремање подлога са антитуберкулотима	71
6.2. Бактеријска суспензија	75
6.3. Засејавање бактеријске суспензије	77
6.4. Читање теста резистенције	78
6.5. Контрола квалитета теста резистенције	79
7. БРЗА ЛАБОРАТОРИЈСКА ДИЈАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛОЗЕ	81
7.1. Директна детекција присуства и осетљивости <i>M. tuberculosis</i> у клиничким узорцима	82
7.2. Изоловање микобактерија у течним подлогама са осетљивим системима за рану детекцију пораста	86
7.3. Брза идентификација изолованих култура микобактерија	89
7.4. Испитивање осетљивости изолованих култура бацила ТБ на изониазид и рифампицин применом брзих техника	92
8. КОНТРОЛА КВАЛИТЕТА	97
8.1. Унутрашња контрола квалитета	97
8.2. Спољашња контрола квалитета	104
8.3. Побољшање квалитета	106
9. ЧУВАЊЕ СОЈЕВА МИКОБАКТЕРИЈА	107
9.1. Краткотрајно чување изолата микобактерија	107
9.2. Дуготрајно чување изолата микобактерија	107
9.3. Поступак припреме и замрзавања суспензије микобактерија	108
9.4. Дуготрајно чување референтних сојева	110
9.5. Транспорт замрзнутих сојева микобактерија	111

10. БЕЗБЕДАН РАД У ЛАБОРАТОРИЈАМА ЗА БАКТЕРИОЛОШКУ ДИЈАГНОСТИКУ ТУБЕРКУЛОЗЕ	113
10.1. Управљачке (менаџерске) активности	113
10.2. Административне мере контроле	116
10.3. Мере контроле средине	118
10.4. Лична заштитна опрема	121
11. ЛИТЕРАТУРА	125
12. ПРИЛОГ – ОБРАСЦИ	127

ПРЕДГОВОР

Предговор првом издању

„Водич за микробиолошку дијагностику туберкулозе“ је написан у складу са „Стручно-методолошким упутством за спречавање и сузбијање туберкулозе у Републици Србији“ и са смерницама Светске здравствене организације. Овим издањем обухваћена је класична бактериолошка дијагностика туберкулозе, која се изводи у рутинским микробиолошким лабораторијама.

Приручник је првенствено намењен лекарима специјалистима микробиологије и лабораторијским техничарима који се баве микробиолошком дијагностиком туберкулозе, а може бити од помоћи и свим осталим здравственим радницима који су укључени у програм заштите становништва од туберкулозе у Србији.

Београд, 2007.

Аутори

Предговор другом издању

Брз развој медицине чини да је и најбоље медицинске текстове неопходно осавремењивати у све краћем временском року. У садашњем, другом издању „Водича за микробиолошку дијагностику туберкулозе“ сва поглавља су измењена у мери потребној да водич и даље буде поуздан сарадник у рутинском раду. Поред тога, у водич је унет и преглед нових метода које су се појавиле последњих година у циљу што брже и што прецизније идентификације микобактерија. Жеља је да микобактериолози и

сви здравствени радници који су укључени у програм контроле туберкулозе буду упознати са методама које ће се у будућности све више користити.

Београд, 2009.

Аутори

Предговор трећем издању

Треће измењено и допуњено издање „Водича за микробиолошку дијагностику туберкулозе“ припремљено је у складу са новим смерницама Светске здравствене организације, Европског центра за контролу и превенцију болести и Европске мреже референтних лабораторија за туберкулозу. Препоруке за дијагностику су прилагођене реалним могућностима у мрежи лабораторија у Србији и надамо се да ће бити драгоцен водич у свакодневном рутинском раду.

Београд, 2015.

Аутори

1. УВОД

У оквиру националног програма за контролу туберкулозе (ТБ) бактериолошка лабораторија учествује у дијагностици плућне и ванплућне ТБ, у детекцији инфективних облика плућне ТБ, као и у праћењу успеха лечења и потврди излечења по завршетку лечења. Коришћење стандардизованих микробиолошких техника и добра организација лабораторијске мреже обезбеђују квалитетну и поуздану дијагностику ТБ.

Бактериолошко испитивање болесничког материјала (микроскопски препарат и култивисање микобактерија) врши се код сумње на ТБ или у циљу праћења успеха лечења. Узимају се по три узорка болесничког материјала за дијагностиковање обољења, а два узорка ради праћења успеха лечења сваког месеца и на крају лечења. Класична бактериолошка дијагностика траје дуго, најчешће дуже од два до три месеца, и подразумева понављано узимање болесничког материјала. За рутинску дијагностику довољно је испитати микроскопске, културелне и биохемијске особине бацила туберкулозе. Ако је изолат идентификован као *Mycobacterium tuberculosis*, испитује се осетљивост на антитуберкулотике прве линије.

У великим микобактериолошким лабораторијама, поред класичне микробиолошке дијагностике, данас се све више користе нове брзе методе које се заснивају на бржој детекцији раста микобактерија и на молекуларним техникама.

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 осетљив. Насупрот микроскопији, изолација микобактерија у култури је много осетљивији дијагностички метод. У добро организованим лабораторијама културе су позитивне ако је присутно 10 бацила/мл узорка. Међутим, у многим лабо-

раторијама култивисање не достиже поменуто осетљивост. Узрок мање осетљивости култивисања могу бити сви поступци који смањују вијабилност микобактерија, као што су дуг транспорт узорака, прејака обрада и неадекватно центрифугирање.

Применом молекуларних тестова заснованих на амплификацији нуклеинских киселина могу се детектовати микобактерије ако је присутно бар 100 бацила/мл узорка. Резултати се издају у року од 24 до 48 сати од пријема материјала. Тестови су позитивни и ако су у узорку присутни мртви бацили.

1.1. Организација лабораторијске службе за дијагностику туберкулозе

У зависности од дијагностичких техника које се примењују и техничке опремљености, препоручује се организовање микобактериолошких лабораторија у три нивоа:

- периферне – микроскопске лабораторије (лабораторије I нивоа);
- интермедијарне – окружне лабораторије (лабораторије II нивоа);
- централне - регионалне лабораторије (лабораторије III нивоа).

Методe микробиолошке дијагностике и главни задаци лабораторија наведени су у табели 1.1.

У земљи може бити више централних лабораторија, али само једна од њих је Национална референтна лабораторија (НРЛ). НРЛ треба да буде под надзором лабораторије из мреже Супранационалних референтних лабораторија (СРЛ).

Добра организација микобактериолошке службе мора да буде заснована на оптималном обиму рада. Исувише мали број анализа у једној лабораторији поскупљује дијагностику и разлог је недовољног искуства запослених. С друге стране, и превелики број узорака у односу на број запослених може да буде узрок мање квалитетне микобактериолошке дијагностике. Да би микроскопија била квалитетна, препоручује се да једна особа не микроскопира више од 20 препарата дневно, али не ни мање

ВОДИЧ ЗА МИКРОБИОЛОШКУ ДИЈАГНОСТИКУ ТУБЕРКУЛОЗЕ

од 10 до 15 недељно, односно два до три препарата дневно. Квалитетна и рационална дијагностика у лабораторији II нивоа захтева да се прегледа најмање 40 узорака недељно, а у лабораторијама III нивоа треба недељно да се уради бар 10 тестова за испитивање осетљивости на антитуберкулотике. Безбедност на раду мора да буде у потпуности испоштована. У лабораторијама II и III нивоа сви поступци са инфективним материјалима треба да се обављају искључиво у коморама за безбедан рад.

Табела 1.1. Организација микобактериолошких лабораторија

Ниво службе	Микробиолошка дијагностика	Друге активности
Лабораторије I нивоа	<ul style="list-style-type: none">• Директна микроскопија (бојење по Ziehl-Neelsenу)	<ul style="list-style-type: none">• Транспорт материјала• Годишњи извештај о раду
Лабораторије II нивоа	<ul style="list-style-type: none">• Обрада болесничког материјала• Директна микроскопија (бојење по Ziehl-Neelsen-у или флуорохромима)• Изолација микобактерија• Идентификација <i>M. tuberculosis</i>	<ul style="list-style-type: none">• Обука микроскописта• Контрола квалитета микроскопије у лабораторијама I нивоа• Годишњи извештај о раду
Лабораторије III нивоа	<ul style="list-style-type: none">• Обрада болесничког материјала• Директна микроскопија (бојење по Ziehl-Neelsen-у или флуорохромима)• Изолација микобактерија• Идентификација микобактерија• Испитивање осетљивости микобактерија на антитуберкулотике	<ul style="list-style-type: none">• Обука за лабораторије II нивоа• Контрола квалитета микробиолошке дијагностике у лабораторијама II нивоа• Надзор над лабораторијама• Праћење резистенције бацила туберкулозе• Научно-истраживачки рад• Годишњи извештај о раду

Добра организација националне мреже микобактериолошких лабораторија по нивоима доприноси ефикасној контроли ТБ у једној земљи. Лабораторијска дијагностика ТБ треба да се ради у мањем броју адекватно опремљених лабораторија у којима ради едукован кадар, а које су укључене у систем контроле квалитета.

Мрежу микобактериолошких лабораторија у Србији чини 29 лабораторија. Две лабораторије раде само директну микроскопију, 23 лабораторије директну микроскопију и изолацију микобактерија, а комплетна идентификација и испитивање осетљивости микобактерија на антитуберкулотике ради се у 4 регионалне лабораторије, од којих је једна НРЛ (Табела 1.2.). Министарство здравља Републике Србије је донело решење о именовању референтних лабораторија за контролу заразних болести 2008. године, на основу кога је НРЛ за туберкулозу микобактериолошка лабораторија Клиничког центра Србије и Институт за микробиологију и имунологију Медицинског факултета у Београду. НРЛ сарађује са СРЛ из Борстела, Немачка (National Reference Center for Mycobacteria, Forschungszentrum, Borstel).

1.2. Задаци националне референтне лабораторије за туберкулозу

С обзиром на значај и улогу у контроли ТБ у земљи, НРЛ мора да буде призната од стране министарства здравља. НРЛ треба да успостави сарадњу са другим међународним референтним лабораторијама за микобактерије и да на основу компетентности за области референтних активности буде и међународно призната.

Основни задаци НРЛ су:

1. Експертиза:

- идентификација и типизација сојева:
 - потврда резултата других лабораторија у идентификацији микобактерија и типизација сојева;
 - идентификација и класификација неуобичајених сојева;
- формирање колекције сојева и достављање референтних сојева другим лабораторијама;

- припрема националног водича за дијагностику инфекција изазваних микобактеријама;
- пружање консултација лекарима и клиничким микробиолозима у свим случајевима инфекција изазваних микобактеријама;
- организација континуиране едукације за лекаре микробиологе и лабораторијске техничаре;
- научно-истраживачки рад.

2. Активности у области надзора:

- контрола ТБ у земљи;
- праћење резистенције на антитуберкулотике;
- учешће у националним и међународним мрежама надзора микобактериолошких лабораторија;
- организовање програма међулабораторијског испитивања у сарадњи са међународним организацијама за међулабораторијска испитивања;
- надзор над интрахоспиталним инфекцијама.

3. Извештавање:

- достављање извештаја Министарству здравља о бактериолошкој дијагностици ТБ у земљи.

ВОДИЧ ЗА МИКРОБИОЛОШКУ ДИЈАГНОСТИКУ ТУБЕРКУЛОЗЕ

Табела 1.2. **Мрежа микобактериолошких лабораторија у Републици Србији 2015. године**

Ниво лабораторије	Установа	Округ
Микроскопске лабораторије - лабораторије I нивоа	Косовска Митровица – Здравствени центар	
	Бујановац – Дом здравља	Пчињски
Окружне лабораторије – лабораторије II нивоа	Шабац – Општа болница	Мачвански
	Лозница – Општа болница	
	Ваљево – Општа болница	Колубарски
	Смедерево – Општа болница	Подунавски
	Пожаревац – ЗЗЈЗ	Браничевски
	Крагујевац – ИЗЈЗ	Шумадијски
	Бор – Општа болница	Борски
	Зајечар – ЗЗЈЗ	Зајечарски
	Сокобања – Специјална болница за плућне болести	
	Ужице – Општа болница	Златиборски
	Чачак – Општа болница	Моравички
	Краљево – ЗЗЈЗ	Рашки
	Нови Пазар – Општа болница	
	Крушевац – Општа болница	Расински
	Прокупље – Општа болница	Топлички
	Пирот – ЗЗЈЗ	Пиротски
	Лесковац – Општа болница	Јабланички
	Врање – ЗЗЈЗ	Пчињски
	Сурдулица – Специјална болница за плућне болести	
	Сомбор – Општа болница	Западнобачки
Суботица – Општа болница	Севернобачки	
Бела Црква – Специјална болница за плућне болести	Јужнобанатски	
Зрењанин – Специјална болница за плућне болести	Средњебанатски	
Регионалне лабораторије - лабораторије III нивоа	Градски завод за плућне болести и ТБ, Београд	Београдски
	Клинике за плућне болести и ТБ, Кнез Село	Нишавски и јужна Србија
	Институт за плућне болести Војводине	Јужнобачки и Војводина
Национална референтна лабораторија	Клинички центар Србије и Медицински факултет Универзитета у Београду	Део града Београда и Република Србија

ЗЗЈЗ – Завод за јавно здравље; ИЗЈЗ – Институт за јавно здравље;

2. УЗИМАЊЕ И ТРАНСПОРТ УЗОРАКА ЗА МИКОБАКТЕРИОЛОШКИ ПРЕГЛЕД

Правилно узимање узорка је први и најважнији корак у дијагностици сваке инфекције. Придржавање правила приликом узимања и транспорта узорка омогућава добијање клиничког материјала одговарајућег квалитета и поузданих резултата лабораторијске анализе. Ако узорак није правилно одабран и/или узет и ако добијени узорак није одговарајућег квалитета, ниједан поступак у току лабораторијске обраде и анализе узорка не може исправити грешку. Грешка при узимању узорка је најчешћи разлог неуспеха у откривању стварног узрочника инфекције или постављања погрешне дијагнозе и примене погрешне или чак штетне терапије.

2.1. Основни принципи правилног узимања узорка

- Узорак за лабораторијску дијагностику туберкулозе (ТБ) и испитивање осетљивости бацила ТБ на антитуберкулотике треба узети пре почетка терапије.
- За узимање узорка треба користити искључиво стерилну опрему (инструменти и посуде/контејнери) уз строго придржавање правила асептичке технике рада како би се избегла контаминација узорка физиолошким микрофлором и микроорганизмима из окружења.
- Брис није одговарајуће средство за узимање узорка за микобактериолошки преглед. Због брзог сушења и мале количине узетог материјала, брис не пружа одговарајуће услове за преживљавање микроорганизама, тако да се проценат позитивних култура значајно смањује.
- Узорак треба узети у довољној количини. Мала количина узорка може дати лажно негативан резултат. Вероватноћа изоловања бацила ТБ из неких узорака, као што су цереброспинална течност и серозне течности (плеурална и перитонеална), расте са повећањем запремине или броја добијених узорака.

- Узорак се мора послати у микобактериолошку лабораторију одмах после узимања и дозвољено трајање времена транспорта је најдуже до 48 сати.
- Уколико се узорак не може транспортовати одмах по узимању, треба га чувати на температури +4°C (фрижидер) и што пре послати у микобактериолошку лабораторију.
- Узорак се увек шаље у лабораторију са попуњеним упутом. Упут треба да садржи тачне податке о пацијенту (име и презиме, датум рођења, пол, матични број), податке о болести (новооболели/раније лечен, дијагностика/праћење лечења, профил резистенције у току ранијег лечења), податке о узорку (датум и време узимања), дијагностички тест који се тражи (култивисање, тест испитивања осетљивости на антитуберкулотике, молекуларни тест) и податке о лекару и установи која шаље узорке (укључујући број телефона).
- Узимање, паковање и транспорт узорака су одговорност особе/установе која шаље узорке у микобактериолошку лабораторију. Препорука је да пошиљалац унапред обавести лабораторију о слању узорака, а лабораторија би требало да потврди њихов пријем.

2.2. Специфични принципи за правилно узимање узорака

2.2.1. Спутум

Спутум је узорак који се најчешће испитује у микобактериолошкој лабораторији. Најбоље време за узимање спутума је ујутру, један или два сата након буђења, али пре првог obroка, јер се честице хране могу појавити на директном микроскопском препарату и отежати његово тумачење. С обзиром да за лабораторијску дијагностику плућне ТБ треба узети најмање три узорка, потребно је да бар један буде узорак јутарњег спутума. Препоручује се узимање три узорка спутума у току два узастопна дана према следећем распореду:

- један узорак „на лицу места“ под надзором када се пацијент обрати лекару;
- један узорак јутарњег спутума (најбоље следећег дана) код куће;

- један узорак „на лицу места“ под надзором када пацијент донесе узорак јутарњег спутума у лабораторију или лекару.

Сваки узорак спутума треба прегледати као посебан узорак и не треба их спајати. Сакупљање спутума током 24 сата се не препоручује због могућности контаминације другим микроорганизмима, укључујући и нетуберкулозне микобактерије (нзм).

Спутум је густ, полуврсте конзистенције и слузав, али може бити течан са деловима пурулентног материјала или некротичног ткива из лезија у плућима. Боја спутума може да варира од беле до загаситозелене. Ако је присутна крв, спутум је црвенкасте или браон боје. Ретка, прозирна пљувачка или назофарингеални секрет нису спутум и немају значаја у дијагностици ТБ. Здравствени радник треба да се увери да је пацијент дао спутум на основу присуства мукозног или мукопурулентног садржаја. Квалитет спутума има већи значај него запремина.

Оптимална количина спутума је 3 до 5 мл. Најмања прихватљива количина је 2 мл ако је квалитет узорка задовољавајући. Уколико се добије само пљувачка или спутум у количини мањој од 2 мл, узорак ипак треба обрадити и прегледати, али уз напомену да количина и/или квалитет нису били одговарајући. У циљу праћења успеха терапије треба узети по два узорка спутума сваког месеца, док два узастопна узорка не буду култура негативни. Узорке спутума добијене од пацијената у току лечења треба прихватити и прегледати, иако изгледом најчешће подсећају на саливу. На крају терапије је обично тешко добити узорак спутума, јер највећи број пацијената више нема продуктиван кашаљ.

Код пацијената који не искашљавају, узорак спутума се може сакупити методом индукције, тј. инхалацијом аеросола хипертоничног раствора натријум-хлорида (5% NaCl). Пошто спутум добијен индукцијом подсећа својим изгледом на саливу, врло је важно да овакав узорак буде обележен ознаком „индукован“, како не би био одбачен као неодговарајући.

2.2.1.1. Техника узимања спутума

Здравствено особље треба да врши директан надзор приликом узимања узорка спутума „на лицу места“, како би се добио узорак одговарајућег квалитета и поуздани резултати лабораторијске анализе. Приликом кашљања настаје аеросол који садржи бациле ТБ и стога представља ризик за здравствено особље и друге особе/пацијенте у околини. Препорука је да се узорак спутума сакупи у издвојеној просторији са одговарајућом вентилацијом, у нашим условима најчешће природном, и ултравиолетном (УВ) лампом. Никада не треба вршити узимање узорака у микробиолошким лабораторијама. Мере које се могу предузети да би се смањио ризик од преношења инфекције приликом узимања узорка спутума су следеће: приликом кашљања пацијент треба да покрије уста руком или марамicom, а особа која надзире узимање узорка треба да стоји иза (а не испред) пацијента.

Узорак јутарњег спутума пацијент сам узима (код куће) и доноси у лабораторију или лекару, осим ако се не налази на болничком лечењу. У даљем тексту наведена су најважнија упутства за правилно узимање узорака спутума.

- Пацијенту треба објаснити да се спутум добија дубоким кашљањем.
- Пре искашљавања пацијент треба да испере уста водом.
- Пацијент треба два пута дубоко да удахне, задржавајући дах неколико секунди после сваког удаха, а затим да издахне полако. После трећег удаха треба да форсирано издахне ваздух. Затим треба да удахне и да се приликом издисања дубоко и снажно накашље. Ово би требало да покрене секрет из доњих делова респираторног тракта. Спутум треба да сакупи у устима, а затим да га пажљиво испљуне у посуду.
- Ивицу посуде треба да прислони испод доње усне и да испљуне целокупну количину секрета у њу.
- Објаснити пацијенту да не сме додиривати унутрашњост посуде и унутрашњу површину поклопца прстима или другим предметима.

2.2.1.2. Посуда/контејнер за сакупљање узорка спутума

Посуде треба да буду стерилне, за једнократну употребу и одговарајућег облика који треба да олакша узимање узорка, нарочито када пацијенти сами сакупљају узорак. Да би се олакшао избор посуде за узимање узорка, треба се руководити следећим препорукама:

- широки отвор (најмање 35 мм у пречнику);
- запремина од 50 мл;
- направљена од прозирног материјала што омогућава процену запремине и квалитета узорка без отварања посуде;
- поклопац треба да буде на навој;
- дизајнирана тако да се лако обележава (на зидовима, а не на поклопцу), најбоље са налепницом.

Посуда/контејнер која испуњава наведене критеријуме и која се препоручује за узимање узорака спутума јесте пластична (од полипропилена) епрувета за центрифугирање запремине 50 мл. Употребом ове посуде избегава се поступак пребацивања узорка из примарног контејнера у епрувету за центрифугирање приликом обраде и смањује могућност контаминације. Епрувету за центрифугирање увек треба користити када пацијент даје узорак „на лицу места“. На тржишту се могу наћи и специјални комплети намењени узимању узорака спутума, који се састоје од посуде/контејнера за узорак са поклопцем на навој (конична епрувета за центрифугирање од 50 мл) и спољашње посуде/контејнера са поклопцем.

2.2.2. Бронхоалвеоларни лават (БАЛ) и бронхијални аспират

Најмања количина узорка бронхијалног аспирата износи 2-5 мл, а лавата 20-40 мл. Пре примене бронхоскопије требало би испитати три узорка спонтаног или индукованог спутума. Након извршене бронхоскопије такође би требало извршити преглед узорка спутума.

2.2.3. Гастрични лават (испирак желуца)

Узорак гастричног лавата треба узети у епрувету са 100 мг натријум-бикарбоната (NaHCO_3). Период од тренутка узимања узорка до почетка обраде у лабораторији може да траје најдуже до 4 сата.

2.2.4. Брис ларинкса

Узорак се узима стерилним памучним брисем рано ујутро, пре него што пацијент конзумира воду и храну. Да би се спречило сушење бриса током транспорта, у контејнер/епрувету за брис треба додати неколико капи физиолошког раствора.

2.2.5. Урин

Узима се целокупан први јутарњи урин, после прања спољашњих гениталија водом и сапуном без употребе антисептика. Узорак се узима у стерилну посуду са широким отвором. Запремина узорка урина треба да буде најмање 15 мл, а запремина посуде најмање 200 мл. Потребно је узети три узорка јутарњег урина у току три узастопна дана.

2.2.6. Столица

Узорак фецеса се узима непосредно после дефекације у чисту посуду без трагова дезинфицијенаса. Стерилном кашичицом која је причвршћена за поклопац посуде узима се 1-2 г фецеса са више места. Материјал треба што пре послати у лабораторију без додавања конзерванса. Потребно је прегледати најмање три узорка столице.

2.2.7. Крв

Узорак крви треба узети поштујући принципе асептичке технике рада. Оптимална запремина узорка крви за микобактериолошку дијагностику износи 5-10 мл уз додатак антикоагуланса (натријум-цитрат). Алтернативно се узорак крви може инокулисати директно у течну хранљиву подлогу за култивисање микобактерија.

2.2.8. Ткива

Узорак ткива треба узети поштујући принципе асептичке технике рада и ставити у стерилну посуду са 2-5 мл стерилног физиолошког раствора, без фиксатива или конзерванса.

2.2.9. Телесне течности

Оптимална запремина узорка телесне течности која се препоручује за култивисање микобактерија је различита: 3 мл цереброспиналне течности

сти, 3-5 мл ексудата, перикардијалне или синовијалне течности, 10-15 мл перитонеалне течности. Најмања потребна запремина плеуралног ексудата је 20-50 мл, али треба имати у виду да ово није репрезентативан узорак, јер се бацили ТБ углавном налазе у плеури, а не у плеуралној течности. Узорак телесне течности треба ставити у стерилну посуду. Течности које садрже фибриноген (плеурална, перикардијална или перитонеална течност) треба сакупити у посуду са додатком антикоагуланса. Као антикоагуланси могу се употребити стерилни 10% калијум-оксалат (0,01-0,02 мл по мл течности), хепарин (0,2 мг/мл) или 20% натријум-цитрат (2 капи на 10 мл течности).

2.3. Транспорт узорака

Узорци треба да стигну у микобактериолошку лабораторију што пре после узимања, а најкасније у року од 48 сати. Транспорт узорака је одговорност установе која шаље узорке на микобактериолошки преглед.

Ако се лабораторија налази у истом граду, узорци се шаљу истог дана када су узети. Препорука је да узорци стигну у лабораторију у току радног времена, како би истог дана прошли кроз поступак обраде. Уколико се узорци шаљу у други град, сакупљају се и заједно транспортују у лабораторију једном или два пута недељно. Ипак, треба имати у виду да је препорука да се узорци транспортују у року од 48 сати после узимања.

До транспорта узорци се чувају у посебној кутији у фрижидеру. Изузетак су узорци крви који се чувају на собној температури. За транспорт узорака треба користити ручне фрижидере са кесама леда.

Сваки узорак мора бити спакован тако да се онемогући изливање садржаја и да издржи промене притиска и друге неповољне утицаје који могу настати у току транспорта. За транспорт узорака спутума треба обезбедити посебан контејнер, као што је ручни фрижидер са кесама леда, у који може да се спакује 20 до 30 узорака усправно, у сталцима, како би се избегло превртање посуда и изливање садржаја. Поклопац треба добро да налаже, а контејнер за транспорт би требало да има механизам за закључ-

чавање. Током транспорта треба га држати у усправном положају, на ниској температури и заштитити од сунца. Уколико се узорци транспортују у други град, сваки узорак треба спаковати у посебну пластичну кесу са затварачем пре стављања у фрижидер за транспорт.

Узорци који се шаљу поштом или авионом треба да буду спаковани у прописану, чврсту посуду која не цури (примарни контејнер), а затим у кутију (секундарни контејнер) од непропусног материјала обложену изнутра апсорбујућим материјалом. У секундарни контејнер се може спаковати више примарних контејнера, али уз довољну количину апсорбујућег материјала. Секундарни контејнер се ставља у посебно паковање за транспорт са материјалом који треба да заштити садржај од механичког оштећења (Слика 1). Препоруке и правила за безбедан транспорт потенцијално инфективног материјала могу се наћи на интернет сајту (www.iata.org) Међународне асоцијације за ваздушни транспорт (International Air Transport Association, IATA).

У условима када се очекује да ће транспорт узорака спутума трајати дуже од 4 дана може се употребити транспортни медијум. Транспортни медијум је раствор 1% цетил-пиридинијум хлорида у 2% натријум-хидроксиду и додаје се узорку у истој количини. Бацили ТБ преживљавају најмање 8 дана у транспортном медијуму. Ови узорци се чувају на собној температури, тј. $>20^{\circ}\text{C}$, јер цетил-пиридинијум хлорид кристализује на ниским температурама. Недостатак употребе транспортног медијума јесте што микобактерије након тога могу да се култивишу само на Левенштајн-Јенсен (Löwenstein-Jensen, LJ) подлози, али не и на другим чврстим хранљивим подлогама. Цетил-пиридинијум хлорид се мора уклонити пре засејавања на хранљиве подлоге, тако да на упуту мора бити назначено да је у питању узорак са додатком транспортног медијума.

За сваку групу узорака која се шаље у микобактериолошку лабораторију треба саставити списак узорака и пацијената од којих су узорци узети, тзв. спроводни лист. Спроводни лист и упуту за сваки појединачни узорак треба да буду спаковани одвојено од посуда са узорцима, у посеб-

ној пластичној кеси са затварачем. Најбоље је ставити их у коверат и причврстити за спољашњу страну контејнера за транспорт. Пре транспорта треба проверити следеће:

- број узорака у контејнеру треба да одговара броју узорака на спроводном листу;
- идентификациони број сваког узорка треба да одговара броју на спроводном листу;
- за сваки узорак треба спаковати упут са подацима о пацијенту, узорку, лекару који шаље узорак и врсти дијагностичког теста који се тражи.

2.4. Пријем узорака

Узорке треба преузети на посебном улазу за пријем узорака придржавајући се следећих правила:

- особа која врши пријем узорака мора да носи личну заштитну опрему (мантил и рукавице);
- контејнер/фрижидер за транспорт ставити у комору за безбедан рад;
- прегледати спољашњост контејнера/фрижидера тражећи знакове оштећења или цурења садржаја; ако се установи изливање садржаја, кутију треба аутоклавирати;
- дезинфиковати спољашњост контејнера/фрижидера памучном или папирном ватом натопљеном одговарајућим дезинфицијенсом (на пример, 70% етанол);
- пажљиво отворити контејнер/фрижидер и прегледати да ли има оштећених или поломљених посуда; ако су узорци спаковани засебно у пластичне кесе, кесе са оштећеним посудама не треба отварати;
- оштећене узорке аутоклавирати; тражити други узорак и забележити разлог оштећења или изливања узорка;
- проверити да ли су узорци обележени одговарајућим бројевима са спроводног листа;
- дезинфиковати унутрашњост контејнера/фрижидера за транспорт;
- одложити рукавице као инфективни отпад и опрати руке;

- унети податке о пацијентима и одговарајућим узорцима у лабораторијски протокол.

Узорке чувати на температури од 2 до 8°C, тј. у фрижидеру, уколико се не могу одмах обрадити. Уколико се приликом провере података на узорку, упуту и спроводном листу уоче неке неправилности, потребно је предузети следеће:

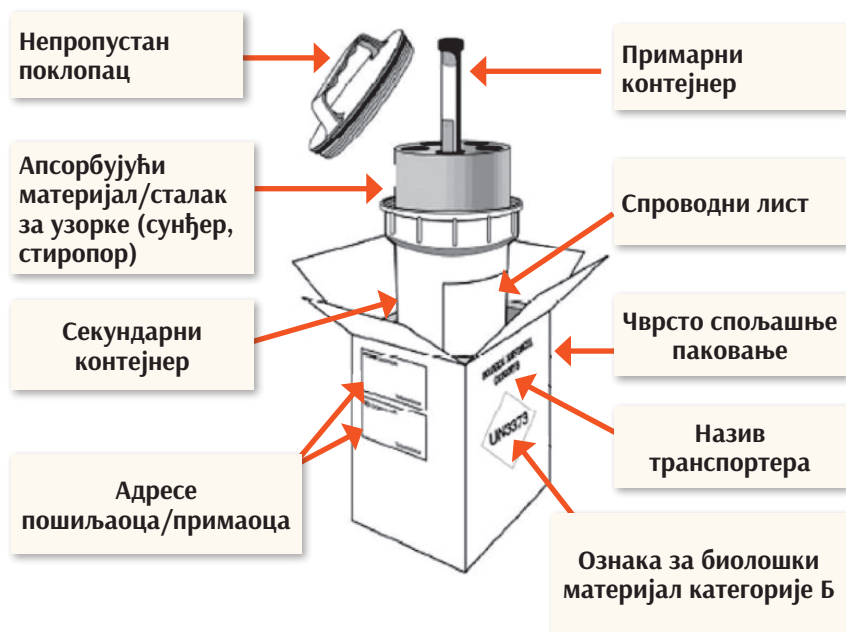
- ако на спроводном листу или упуту неки подаци недостају, потребно је контактирати особу која је послала узорак и тражити потребне податке пре обраде датог узорка;
- узорак који је стигао без упута не може се прихватити и не може бити обрађен док и упут не стигне у лабораторију;
- необележени узорци су неприхватљиви и неће бити обрађени у лабораторији; узорци се увек обележавају на месту узимања, а накнадно се могу обележити у лабораторији само од стране одговорне особе из установе која је послала узорак; напомена о накнадном обележавању узорка мора се забележити у лабораторијском извештају.

2.5. Контрола квалитета узорака и услова транспорта

На пријему узорака мора се утврдити квалитет, запремина и број узорака, као и то да ли су узорци одговарајућег типа. Свако одступање се мора забележити у лабораторијском извештају с обзиром да може утицати на резултате микобактериолошког прегледа.

Приликом пријема узорака треба проверити дужину и услове транспорта. Застој у транспорту и/или изложеност узорака екстремним, неоптималним температурама и другим утицајима без предузимања заштитних мера морају се забележити у лабораторијском извештају.

Слика 1. Пример троструког паковања узорака



3. ОБРАДА УЗОРАКА ЗА МИКОБАКТЕРИОЛОШКУ ДИЈАГНОСТИКУ

Узорци за дијагностику туберкулозе (ТБ) 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 засеје директно на хранљиву подлогу, умножиће се брзо растуће 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 микрофлора од слузи и тада на њу могу деловати 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 применом би селективно била уништена само пропратна микрофлора без оштећења микобактерија. Изабрани начин обраде треба да обезбеди 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 целокупне 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. Начин обраде зависи од врсте болесничког материјала.

Центрифугирање узорака

За концентрацију микобактерија у узорку најчешће се користи центрифугирање. Микобактерије су хидрофобне, јер садрже велику количину липида у ћелијском зиду, тако да ће коришћењем стандардних центрифуга део микобактерија остати у супернатанту и бити одбачен, што свакако умањује проценат позитивних култура. За обраду узорака у микобактериолошкој лабораторији центрифуга мора да има следеће карактеристике:

- Релативна центрифугална сила (RCF) треба да је 3000-3500 × g. Центрифугирањем узорка на 3000 × g током 15 минута таложи се 95% микобактерија. Однос RCF и броја обртаја у минути (revolutions per minute - RPM) дат је у формули:

$$RCF = 1,118 \times 10^{-5} \times r_{\text{max(цм)}} \times \text{RPM}^2$$

(r – полупречник центрифуге се мери од осе ротора до дна епрувете када се ротор окреће).

- Загревање узорака током центрифугирања делује летално на микобактерије и зато је пожељно користити центрифугу са хлађењем (8-10°C), а ако она није доступна, треба додати хладан фосфатни пуфер пре центрифугирања.
- Препоручују се центрифуге које имају “aerosol tight” квалификацију.

То су центрифуге са поклопцем и ротором са фиксираним (такозваним „aerosol proof“) корпуцама.

За центрифугирање користити пластичне епрувете са затварачима са навојем. Због тога што време за обраду материјала треба строго поштовати, потребно је ускладити број узорака који се обрађује са бројем места за епрувете у центрифуги.

У даљем тексту биће описане методе обраде најчешћих узорака који се шаљу на преглед у микобактериолошке лабораторије.

3.1. Обрада спутума

Узорке спутума након пријема треба држати у фризицеру до обраде. У лабораторији спутум не сме бити на собној температури дуже од 1 сат. Време од узимања до обраде узорака спутума не сме бити дуже од 72 сата.

3.1.1. Обрада спутума натријум-хидроксидом

– модификовани метод по Petroffu.

Натријум-хидроксид је токсичан како за микроорганизме контаминанте тако и за *M. tuberculosis*, те је неопходно строго поштовати време обраде. Применом овог 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 засејавају на чврсте хранљиве подлоге.

За обраду се узима 2 до 5 мл спутума. Ако је запремина узорка мања од 2 мл, мањи је проценат позитивних култура, а ако је запремина већа од 5 мл, већи је проценат контаминираних подлога.

Реагенси:

1. 4% натријум-хидроксид (NaOH)

- | | |
|-------------------------|--------|
| - NaOH (висока чистоћа) | 4 г |
| - дестилована вода | 100 мл |

Растворити NaOH у дестилованој води. Разлити у епрувете по 2 мл раствора. Стерилисати у аутоклаву на 121°C током 20 минута. Стерил-

ни раствор NaOH може се чувати у фрижидеру на +4°C до 6 месеци.

2. фосфатни пуфер 0,067 мол/л, рН 6,8

- Раствор А: динатријум фосфат 0,067 мол/л
Растворити 9,47 г Na_2HPO_4 у 1 л дестиловане воде.

- Раствор Б: калијум фосфат 0,067 мол/л
Растворити 9,07 г KH_2PO_4 у 1 л дестиловане воде.

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

Поступак:

- Обележити епрувету за центрифугирање (број узорка) и две епрувете са хранљивом подлогом (број узорка и датум засејавања).
- 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 промешати на вортексу. 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 3000×g на +8°C.
- 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 ресуспендовати у 1-2 мл фосфатног пуфера.
- Пипетом засејати по 2-4 капи (0,1-0,2 мл) седимента на две чврсте хранљиве подлоге.
- Направити препарат од једне капи седимента.

3.1.2. Обрада узорака 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 узорака овим поступком је већи, јер у току обраде само око 30% микобактерија буде убијено. За обраду појединачних узорака потребно је око 40 минута; ако се истовремено обрађује 20 узорака, време обраде је око 60 минута.

Недостатак овог метода обраде је што NALC у раствору брзо губи активност и зато се раствор мора припремати свакодневно. Постоје и комерцијално доступни готови раствори за обраду узорака овим методом.

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 засејати на нову подлогу. За дуже чување седимент пребацити у епрувете са затварачем на навој запремине 1,5-2 мл и чувати на -20°C.

са епруветама на платформу шејкера, подесити брзину тако да се постигне равномерно мешање узорка и раствора за обраду (60 до 80 грм у зависности од модела шејкера). Не мешати садржај прејако, јер услед велике аерације долази до оксидације NALC-а и његове инактивације.

- 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 мг NALC праха директно у епрувету. Промешати садржај.
- После 15 минута налити фосфатни пуфер до нивоа који је 2 цм испод врха епрувете (нпр. до ознаке 50 мл на епрувети). Добро промешати садржај (благо вортексирати или ручно извртати епрувете неколико пута).
- Центрифугирати 15 минута на 3000×g на +8°C.
- 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 ресуспендовати у 1-2 мл фосфатног пуфера.
- Пипетом засејати по 2-4 капи (0,1-0,2 мл) седимента на две чврсте хранљиве подлоге и до 0,5 мл на течну подлогу. Засејавањем више од 0,5 мл седимента у MGIT подлогу мења се рН подлоге, што може довести до флуоресценције и добијања лажно позитивних резултата. 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. За узорке који се засејавају на MGIT подлогу треба се стриктно придржавати описаног про-

токола NALC – NaOH обраде. Високе концентрације NaOH и NALC могу бити разлог за појаву флуоресценције подлоге и лажно позитивног налаза.

3.1.3. Обрада узорака оксалном киселином

Ако је узорак контаминиран бактеријама из рода *Pseudomonas*, за де-контаминацију се користи оксална киселина. После овакве обраде узорци се засејавају само на чврсте хранљиве подлоге.

Реагенси:

5% оксална киселина

оксална киселина	5 г
дестилована вода	100 мл

Разлити у епрувете по 4 мл. Стерилисати у аутоклаву на 121°C 20 минута.

Физиолошки раствор (0,85%)

Поступак

- У епрувету за центрифугирање сипати једнаке запремине спутума и 5% оксалне киселине.
- Промешати на вортексу и оставити на собној температури 15 минута. Повремено промућкати садржај епрувете.
- Налити стерилни физиолошки раствор до нивоа који је 2 цм испод врха епрувете (нпр. до ознаке 50 мл на епрувети). Вортексирати.
- Центрифугирати 15 минута на 3000 × g.
- После центрифугирања не отварати епрувете 5 минута, колико је потребно да се слегне аеросол у њима. Затим пажљиво одлити супернатант у посуду за одлагање отпадног инфективног материјала.
- Седимент ресуспендовати у 1-2 мл дестиловане воде.
- Пипетом засејати по 2-4 капи (0,1-0,2 мл) седимента на две чврсте хранљиве подлоге.
- Направити препарат од једне капи седимента.

3.2. Обрада осталих узорака

3.2.1. Гастрични лават

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

Ако је узорак воденаст, пре деконтаминације центрифугирати га на $3000 \times g$ током 15 минута, а затим седимент ресуспендовати у 5 мл 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.

3.2.2. Урин

Целокупни јутарњи урин разделити у више епрувета и центрифугирати 15 минута на $3000 \times g$. 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.

3.2.3. 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 промешати на вортексу. Оставити на собној температури 15 минута. Пинцетом избацити брис, који је претходно добро исцеђен притискањем уз зид епрувете. После тога се поступа као код обраде спутума.

3.2.4. Цереброспинални ликвор

За узорке ликвора не ради се деконтаминација. Ликвор се центрифугира на $3000 - 3500 \times g$ у трајању од 15 – 20 минута и затим се добијени седимент

засејава на подлогу. Уколико постоји сумња да ликвор није узет асептично и да је контаминиран, урадити деконтаминацију узорка као за спутум.

3.2.5. 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 3000 ×g у трајању од 15–20 минута, седимент ресуспендује у 5 мл стерилне воде и даље обрађује као спутум.

3.2.6. Ткива

Узорке ткива треба исецкати помоћу стерилног скалпела на површини предметног стакла, које је смештено у стерилној петри шољи. На површину стакла преспе се цео садржај посуде са узорком, односно ткиво са стерилним физиолошким раствором. Стерилним скалпелом ситно исецкати 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.

3.2.7. 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 3000 ×g током 15 минута и седимент засејати на хранљиву подлогу.

3.2.8. Столица

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

3.3. Контрола квалитета поступка обраде узорака

3.3.1. Контрола квалитета поступка обраде узорака праћењем учесталости контаминације засејаних подлога

Ниједан процес обраде не омогућава убијање целокупне 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.

3.3.2. 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 LJ подлогу. Засејане подлоге инкубирати на 37°C и пратити пораст у складу са стандардном динамиком праћења пораста микобактерија на LJ 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.

3.3.3. 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 LJ 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 LJ 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 поступка обраде треба засејати на LJ 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 LJ подлогама на којима су засејане одговарајуће концентрације, односно суспензије истих разблажења без обраде и после обраде. Пораст квантитирати према критеријумима за извештавање 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 сме бити већа од једне категорије. Такав налаз позитивне контроле квалитета обраде указује на оптималну „јачину“ поступка обраде узорака. Пример тумачења резултата позитивне контроле квалитета обраде узорака наведен је у Табели 3.1.

Разблажења суспензије <i>M. fortuitum</i>							Резултат контроле
10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}			
без обраде	са обрадом	без обраде	са обрадом	без обраде	са обрадом		
пораст	++++	++++	+++	+++	++	+	оптимална обрада
	++++	+++	+++	+	++	∅	јака обрада

Позитивну контролу поступка обраде треба радити једном недељно заједно са обрадом клиничких узорака и негативном контролом. Три епрувете са позитивном контролом (по 1 мл суспензија *M. fortuitum* 10^{-2} , 10^{-3} и 10^{-4}) треба да буду после клиничких узорака, а пре негативне контроле, која је последња.

4. БОЈЕЊЕ И МИКРОСКОПСКИ ПРЕГЛЕД ПРЕПАРАТА У МИКОБАКТЕРИОЛОШКОЈ ДИЈАГНОСТИЦИ

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.

Микобактерије нису једини ацидоалкохолорезистентни микроорганизми. Родови *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* и *Gordona* су делимично 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 ооцисте родова *Cryptosporidium* и *Isospora*.

4.1. Прављење препарата

Након обраде узорка седимент се користи за прављење препарата и засејавање на хранљиве подлоге. Ако је узорак спутум, директни препарат се може правити и пре обраде. Директни препарати се праве од свих узорака сем од узорака урина, гастричног лавата и бриса ларинкса.

4.1.1. Процедура припремања препарата

- За препарате користити нова предметна стакла која морају бити чиста и без огреботина.
- Предметно стакло обележити на једном крају редним бројем из лабораторијског протокола. За обележавање користити дијамантску оловку. Ако је на крају предметног стакла мат површина, број препарата се може уписати и графитном оловком.
- Седимент добијен на крају обраде узорка ресуспендовати пипетом или езом.

- На центар предметног стакла нанети ресуспендовани седимент:
 - једну кап ако се за рад користи пипета или
 - 2 до 3 езе седимента.
- Ако се препарат прави од необрађеног спутума, езом или дрвеним штапићем се узимају најгушћи делови спутума који су пурулентног изгледа или делови у којима има крви. Дрвени штапић се претходно преломи јер се храпавом површином на месту прелома лакше захваћају густи делови спутума.
- На центру микроскопске плочице, не додирујући ивице плочице, кружним, спорим и уједначеним покретима направити равномеран размаз површине 1x2 цм. Дебљина размаза треба да је таква да се кроз њега назире слова у штампаном тексту. Сувише дебели препарати могу маскирати присуство АРБ; поред тога размаз може и да се сљушти са плочице током рада.
- Размаз оставити да се осуши на ваздуху. Довољно је сушење у трајању од 15 до 30 минута.
- Фиксирати размаз на пламену тако што се 3 пута провлачи кроз пламен, при чему је размаз окренут на горе и свако провлачење кроз пламен траје 1-2 секунде. Водити рачуна да се препарат не прегреје у току фиксирања. Пошто се размаз охлади, може се бојити.

4.2. Бојење препарата по Ziehl-Neelsenu

Бојење по Ziehl-Neelsenu се користи за директне препарате, за потврђивање позитивних директних препарата обојених флуорохромима и за бојење препарата са културе.

За бојење препарата могу се користити раствори припремљени у лабораторији или комерцијално доступни раствори за бојење. Ако се користе готове боје, бојење изводити према упутству произвођача.

4.2.1. Припрема раствора за бојење по Ziehl-Neelsenу

Припремити једнаке волумене раствора карбол фуксина и метил плавог и 2-3 пута већи волумен раствора за одбојавање. Радити пажљиво у просторији која се може добро проветрити, јер кристали фенола и испарења имају корозивно дејство.

• Карбол фуксин 1%:

- базични фуксин	10 г
- 95% етанол	100 мл
- кристали фенола	50 г
- дестилована вода	850 мл

Припрема раствора:

- У стакленој боци растворити кристале фенола у алкохолу.
- Додати базични фуксин и растворити га уз мешање. Ако се прах тешко раствара, додати мало дестиловане воде. Пошто је боја растворена, долити остатак дестиловане воде и добро промешати раствор.
- Пребацити раствор боје у тамну боцу. Означити на боци назив реагенса (карбол фуксин 1%), датум припреме, као и датум када истиче рок трајања. Боцу чувати у орману на собној температури 6-12 месеци.
- Пре употребе филтрирати раствор у мању боцу за бојење.

Напомене:

- На паковању боје која је у облику праха означен је проценат чисте боје. Пре припреме раствора боје израчунати у којој количини расположивог праха боје се налази потребна количина чисте боје за припрему раствора. (Пример: за раствор је потребно 10 г чисте боје; ако располажемо прахом у коме је 80% чисте боје, за припрему раствора треба одмерити 12,5 г праха).
- За припрему раствора боје користити искључиво дестиловану воду, а не водоводску у којој могу бити присутне нетуберкулозне микобактерије (НТМ).

- Кристали фенола су безбојни. Ако промене боју у браон, не треба их користити.

- **Раствор за одбојавање** је 3% кисели алкохол или 25% сумпорна киселина. Увек пажљиво додавати киселину у алкохол или воду.

3% кисели алкохол:

- | | |
|--|--------|
| - 95% етанол (технички степен чистоће) | 970 мл |
| - концентрована хлороводонична киселина
(технички степен чистоће) | 30 мл |

25% H_2SO_4

- | | |
|--|--------|
| - дестилована вода | 750 мл |
| - концентрована сумпорна киселина
(технички степен чистоће) | 250 мл |
- Чувати у тамној боци. Означити на боци назив реагенса, датум припреме и датум када истиче рок трајања. Може се чувати у орману на собној температури 6-12 месеци.

• **Контрастна боја: метилен плаво 0,1%**

- | | |
|------------------------|---------|
| - метилен плаво хлорид | 1 г |
| - дестилована вода | 1000 мл |
- Растворити метилен плаво хлорид у дестилованој води и чувати у тамној боци. Означити на боци име реагенса, датум припреме и датум када истиче рок трајања. Чувати у тамној боци у орману на собној температури 6-12 месеци.
- Пре употребе филтрирати раствор у мању боцу за бојење.

4.2.2. Поступак бојења по Ziehl-Neelsenу:

- Препарате ставити на метални држач. Предметна стакла се не смеју додиривати. Размак између препарата треба да је бар 1 цм. Истовремено не треба бојити више од 12 препарата.

- 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.
- Плочице загревати помоћу пламена са доње стране. Престати са загревањем када се појави пара. Поновити загревање пет пута. Боја не сме да прокључа. Долити боју ако је испарила у току загревања.
- Контактном време са карбол фуксином 10 минута. Оставити да се плочице охладе.
- Испрати плочице дестилованом водом.
- Прелити препарате раствором за одбојавање који треба да стоји 3 минута.
- Препарате добро испрати водом. Одлити вишак воде са препарата.
- Прелити препарате контрастном бојом. 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.

4.3. Бојење препарата флуоресцентним бојама

Препарати обојени флуорохромима (аурамин, родамин) микроскопирају се флуоресцентним микроскопом. Користе се објективи мањег увећања (25x, 45x) у односу на микроскопирање препарата обојених по Ziehl-Neelsenу, услед чега се препарат може брже прегледати. Бојење флуоресцентним бојама се препоручује као скрининг када је потребно прегледати велики број препарата. Прегледање препарата обојених на овај начин траје око 2 минута, а када је препарат бојен карбол фуксином и до 10 минута. Флуоресцентном микроскопијом се брже елиминишу негативни препарати. Сви позитивни препарати се морају потврдити бојењем по Ziehl-Neelsenу. За детекцију АРБ бојење флуорохромима је осетљивије у односу на бојење по Ziehl-Neelsenу. Бојење флуорохромима се не препоручује за препарате са културе.

Од флуоресцентних боја најчешће се користе аурамин О и аурамин-родамин. Аураминоом обојене микобактерије имају жуту флуоресцентну боју, а аурамин-родамин бојење се карактерише жутонаранџастом флуоресцентном бојом бацила. Техника бојења је иста за обе боје. За бојење препарата могу се користити раствори припремљени у лабораторији или комерцијално доступни раствори за бојење.

4.3.1. Реагенси за флуорохромно бојење

• Аурамин О:

- аурамин О	0,1 г
- 95% етанол (технички степен чистоће)	10 мл
- кристали фенола	3 г
- дестилована вода	87 мл

Припрема раствора:

- Растворити аурамин у етанолу. Растворити кристале фенола у води. Помешати ова два раствора. Пребацити раствор боје у тамну боцу.
- Означити на боци назив реагенса, датум припреме и датум истека рока трајања. Чувати на тамном и хладном месту, на собној температури до 3 месеца.

Напомена: Аурамин је канцероген и треба избегавати директни контакт са прахом или раствором.

• Раствор за одбојавање:

- концентрована хлороводонична киселина	0,5 мл
- 70% алкохол (технички степен чистоће)	100 мл

- Пажљиво додати концентровану хлороводоничну киселину у алкохол.
- Чувати у тамној боци. На боци означити назив реагенса, датум припреме и датум када истиче рок трајања. Чувати на собној температури до 3 месеца.

- Контрастна боја – користи се калијум перманганат или акридин оранж

Калијум перманганат:

- | | |
|---|--------|
| - калијум перманганат (KMnO_4) | 0,5 г |
| - дестилована вода | 100 мл |
- Растворити KMnO_4 у дестилованој води и чувати у добро затвореној боци.
 - Означити на боци назив реагенса, датум припреме и датум када истиче рок трајања. Чувати до 3 месеца на собној температури.

Акридин оранж:

- | | |
|--|--------|
| - динатријум хидроген фосфат (Na_2HPO_4) | 0,01 г |
| - дестилована вода | 100 мл |
| - акридин оранж | 0,01 г |
- Растворити Na_2HPO_4 у дестилованој води. Додати акридин оранж. Раствор чувати у тамној боци заштићеној од светлости и топлоте.
 - На боци означити име реагенса, датум припреме и датум када истиче рок трајања. Боцу чувати на собној температури до 3 месеца.

4.3.2. Бојење флуоресцентним бојама

- Поставити препарате на метални држач. Предметна стакла се не смеју додиривати. Истовремено не треба бојити више од 12 препарата.
- Пре употребе добро промућкати боју. Препарате прелити аураминном. Не стављати филтер папир на препарате. Боја треба да стоји 15 минута без загревања.
- Препарате пажљиво испрати дестилованом водом и одлити вишак воде. Не користити водоводску воду јер садржи хлор који омета флуоресценцију.
- Прелити препарате 0,5% киселим алкохолом. Одбојавање траје 2 минута.
- Препарате поново пажљиво испрати дестилованом водом и одлити вишак воде.
- Прелити препарате калијум перманганатом или акридин оранжом у трајању од 2 минута. Ако је бојење калијум перманганатом дуже од 2 минута, интензитет флуоресценције слаби.
- Испрати препарат дестилованом водом.
- Сушити препарате на ваздуху без брисања филтер папиром.

4.4. Микроскопија

Препарате треба прегледати веома пажљиво квалитетним бинокуларним светлосним микроскопом, ако су обојени карбол фуксином. После бојења аурамином, препарате прегледати флуоресцентним микроскопом. Препарати обојени флуорохромима морају се микроскопски прегледати истог дана када су обојени или сутрадан, ако се препарати држе у фрижидеру преко ноћи.

4.4.1. Процедура прегледа обојеног микроскопског препарата:

- Микроскопирање почети прегледом познатог позитивног и негативног директног контролног препарата.
- На препарат обојен карбол фуксином сипати кап имерзионог уља водећи рачуна да се не додирује препарат капаљком за уље, како би се избегла контаминација уља са АРБ и појава лажно позитивних налаза.
- Посматрати под имерзијом. Прегледати најмање 100 видних поља пре 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 имерзиони објектив пре 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 решења приказани су у Табели 4.1.

Табела 4.1: Проблеми приликом микроскопирања

Проблем	Вероватан узрок	Решење
Мрачно видно поље	Ниско постављен кондензор.	Подигнути кондензор.
	Затворена дијафрагма кондензора.	Отворити дијафрагму.
Тамне мрље у видном пољу које се померају са окретањем окулара	Прљав окулар.	Очистити окулар.
	Огребана површина окулара	Заменити окулар.
Нејасна слика под имерзијом	Наопако постављена плочица.	Окренути плочицу.
	Мехурићи ваздуха у имерзионом уљу.	Брзо померити препарат лево-десно.
	Сувише густо, лепљиво уље.	Узети уље мање вискозности (или препоручено имерзионо уље).
	Прљавштина на објективу.	Очистити сочива.
Видно поље је и даље мутно и замагљено	Пенетрација уља између сочива објектива (кедрово уље, ксилол)	Замена објектива.
	Оштећење објектива (немарно руковање, грубо фокусирање, мењање препарата).	Замена објектива.

4.4.2. Морфолошке карактеристике ацидоалкохолорезистентних бацила

- На препарату се АРБ виде као црвени прави или благо савијени штапићи дужине 1 до 10 μm ; могу бити мање или више гранулирани; распоређени су појединачно или у групи; позадина је обојена плаво.
- Микобактерије се не могу идентификовати до нивоа комплекса/врсте само на основу микроскопских особина.
- Аурамино обожене микобактерије имају жуту флуоресцентну боју на тамној позадини.
- Ацидоалкохолорезистенција брзорастућих НТМ може бити варијабилна.

4.5. Издавање резултата директне микроскопије

Микроскопским прегледом директног препарата треба да се утврди да ли су присутни АРБ и да се процени њихов приближан број по посматраном видном пољу. Резултат микроскопског прегледа треба издати што пре, најкасније 24 часа од пријема узорка. Резултат микроскопског прегледа директног препарата треба да садржи следеће информације:

- оцену квалитета узорка спутума;
- метод бојења;
- АРБ присутни или нису присутни;
- број АРБ на препарату изражен у препорученим семиквантитативним категоријама.

Упутства за квантитирање АРБ у директним препаратима обојеним по Ziehl-Neelsenу наведена су у Табели 4.2., а за препарате обојене флуорохромима у Табели 4.3.

Табела 4. 2. **Квантитирање АРБ у директним препаратима обојеним по Ziehl-Neelsenу**

Број АРБ	Поља	Извештај
Нема АРБ	на 100 видних поља	Нису виђени АРБ (Нема АРБ на 100 поља)
1-9 АРБ	на 100 видних поља	забележити тачан број АРБ (1-9 АРБ на 100 поља)
10-99 АРБ	на 100 видних поља	1+ (10-99 АРБ на 100 поља)
1-10 АРБ	на једном пољу	2+ (1-10 АРБ по пољу у 50 поља)
више од 10 АРБ	на једном пољу	3+ (више од 10 АРБ по пољу на 20 поља)

Табела 4.3. **Квантитирање АРБ у директним препаратима обојеним флуорохромима**

Резултат	Бојење карбол-фуксином (увеличање 1000x)	Број АРБ		
		Бојење флуорохромима		
		(увеличање 250x)	(увеличање 450x)	(увеличање 630x)
Тачан број АРБ	1 - 9 / 100 поља	број нађених бацила	број нађених бацила	број нађених бацила
1+	10 - 99 / 100 поља	поделити са 10	поделити са 4	поделити са 2
2+	1 - 10 / пољу			
3+	> 10 / пољу			

Пример: Нађено 20 АРБ по једном пољу користећи увеличање 450x. Тај број треба поделити бројем 4 (види табелу) и добија се 5 бацила по видном пољу, што је број бацила који би се видео ако би се препарат посматрао под увећањем 1000x. Према томе, лабораторијски налаз би зато био 2+, а не 3+ како би се читавало без препоручене корекције.

Најчешћи узроци издавања лажно позитивних и лажно негативних резултата директне микроскопије, као и корективне мере које треба предузети у тим ситуацијама приказани су у Табели 4.4. и Табели 4.5.

Табела 4.4. **Најчешћи узроци издавања лажно позитивних резултата директне микроскопије**

Узрок	Корективне мере
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 свеже растворе боја (без преципитата); проверити 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; заменити бочицу са уљем када постоје знаци контаминације

Табела 4.5. Најчешћи узроци издавања лажно негативних резултата директне микроскопије

Узрок	Корективне мере
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 нанетог 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 микроскопских поља

Последице лажно позитивних налаза:

- почетак непотребног лечења;
- код праћења ефеката терапије иницијална фаза лечења се непотребно продужава.

Последице лажно негативних налаза:

- болесник се не лечи што има за последицу напредовање и ширење болести;
- иницијална фаза лечења се не продужава и лечење је неправилно.

4.6. Контрола квалитета бојења по Ziehl-Neelsenу

За сваку нову серију комерцијалних боја или боја припремљених у лабораторији, као и приликом сваког поступка бојења клиничких узорака треба извршити контролу квалитета коришћених реагенаса. Као позитивну контролу треба користити културу *M. tuberculosis* H37Ra, а као негативну контролу културу *Escherichia coli*. 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 светлости 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 реагенаса.

За унапређење квалитета микроскопског прегледа директних препарата важна препорука је да микроскопирање директних препарата клиничких узорака увек 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.

5. ИЗОЛАЦИЈА И ИДЕНТИФИКАЦИЈА МИКОБАКТЕРИЈА

5.1. Хранљиве подлоге

За култивисање микобактерија користе се чврсте хранљиве подлоге (са јајима или са агаром) и течне подлоге. Додавањем антибиотика подлогама инхибира се раст контаминаната.

Култура представља златни стандард за дијагностику туберкулозе (ТБ) и сваки узорак треба засејати најмање на једну чврсту и једну течну подлогу. Предност чврстих подлога је што се на њима на основу морфологије колонија могу уочити мешане културе и присуство контаминаната, јефтиније су од течних подлога и лако се праве. Течне хранљиве подлоге су осетљивије од чврстих, на њима микобактерије брже расту, а главни недостатак им је већи проценат контаминације него на чврстим подлогама. Уколико из финансијских разлога није могуће користити течне подлоге за сваки узорак, минимална препорука је да се на течне подлоге, као осетљивије, засејавају бар узорци у којима се очекује мањи број микобактерија и узорци који се не могу понављано узимати, односно узорци за дијагностику ванплућне ТБ.

5.1.1 Чврсте хранљиве подлоге

5.5.5.1. Подлоге са јајима

Löwenstein-Jensenova подлога (LJ) најчешће се користи за примоизолацију бацила ТБ. Садржи малахит зелено као инхибитор раста за контаминанте. Подлога са глицеролом се користи за изолацију *M. tuberculosis*, а за изолацију *M. bovis* користи се LJ подлога у којој је уместо глицерола додат натријум пируват. **Ogawa** подлога има састав као и LJ, али без аспарагина.

Подлоге са јајима морају се чувати у фрижидеру. Подлоге са јајима које се праве у лабораторији могу се чувати до месец дана, а комерцијално

доступне до истека назначеног рока трајања. Недостатак ових подлога је што бацил ТБ на њима расте после три и више недеља. Ако на подлогама расту контаминанти, веома брзо прерасту читаву површину подлоге и такве се подлоге морају одбацити.

Прављење LJ подлоге

Састојци:

Раствор минералних соли

- калијум дихидроген фосфат (KH_2PO_4)	2,4 г
- магнезијум сулфат ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	0,24 г
- натријум цитрат	0,6 г
- аспарагин	3,6 г
- глицерол (хемијски чист)	12 мл
- дестилована вода	600 мл

Растворити састојке уз загревање. Стерилисати у аутоклаву на 121°C 30 минута. Раствор чувати у фрижидеру.

Раствор малахит–зеленог 2%

- малахит-зелено боја	2,0 г
- стерилна дестилована вода	100 мл

Под асептичним условима растворити боју у стерилној води стављањем раствора у термостат на 37°C 1-2 сата. Раствор чувати у тамним боцама. Ако се раствор дуже чува, таложи се малахит зелено и раствор постаје светлији. Тада се мора направити нов раствор боје.

Хомогенизована цела јаја

Свежа кокошија јаја (не старија од седам дана) са фарме где се храни за кокошке не додају антибиотици, пажљиво опрати четком у топлој води и алкалном сапуну. Оставити јаја 30 минута у раствору сапуна, пажљиво их испрати текућом водом и потопити их у 70% етанолу током 15 минута. Пре руковања чистим сувим јајима опрати руке. Разбијати јаја стерилним ножем у стаклену посуду и умутити их стерилном мутилицом или стерилним миксером.

Припремање LJ подлоге

Под асептичним условима у стерилној посуди помешати:

- раствор минералних соли 600 мл
- раствор малахит-зеленог 20 мл
- хомогенизована јаја (20 – 25 јаја зависно од величине) 1000 мл.

За култивисање *M. bovis* LJ подлози се додаје 0,5% натријум пируват (изоставља се глицерол, а у раствор минералних соли се додаје 8,0 г натријум пирувата).

Подлога се разлива у количини од 6 до 8 мл у стерилне епрувете са затварачима на навој, које се затим добро затворе. Коагулисати подлогу у року од 15 минута од разливања, да би се спречило таложење састојака.

Ако се за припрему LJ подлоге користи комерцијално доступна база, треба доследно пратити упутство произвођача.

Коагулисање подлоге

Пре употребе загрејати коагулатор на 80°C. Ставити епрувете у укошеном положају у коагулатор и коагулисати подлогу 45 минута на 80°C. Загревањем током коагулисања разливена стерилна течна подлога постаје чврста.

Чување подлога

На подлоге уписати датум припреме, ставити их у пластичну кесу и чувати исправно у фрижидеру не дуже од 4 недеље.

5.1.1.2. Подлоге са агаром

Подлоге Middlebrook 7H10 и 7H11 се припремају од комерцијално доступне базе којој се додаје OADC суплемент (олеинска киселина, албумин, декстроза, каталаза).

Подлога се разлива или у епрувете у укошеном положају или у Петри шоље. Морфологија колонија се јасније уочава на подлози са агаром него на подлогама са јајима. Пошто је подлога транспарентна, микроскопом се већ после недељу дана од засејавања узорка могу уочити карактеристичне

микрoколоније са cord формацијом. Недостатак Middlebrook подлоге је што се брже суше од подлога са јајима. Подлоге се чувају у фрижидеру до 4 недеље, јер након тог периода може доћи до ослобађања формалдехида, који инхибира раст микобактерија.

5.1.2. Течне подлоге

На течним подлогама микобактерије расту знатно брже него на чврстим. На течној Middlebrook 7H9 подлози *M. tuberculosis* расте за 7-14 дана, док на Middlebrook 7H11 агару расте за 18-28 дана и на LJ подлози тек након 21-42 дана.

За детекцију пораста микобактерија на течним подлогама најчешће се користе аутоматизовани системи. Два оваква система који се користе у мрежи лабораторија у Србији су ВАСТЕС™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System (Becton, Dickinson and Company Diagnostic Systems) и MB/VacT Mycobacteria Detection System или VacT/ALERT Microbial Detection System (bioMérieux). Поред примене у оквиру аутоматизованог система, MGIT течне подлоге доступне су и као мануелни BBL™ MGIT™ систем. Основни принципи примене течних подлога са осетљивим системима за рану детекцију пораста микобактерија описани су у одељку 7.2.

5.1.3. Контрола квалитета подлога

Детаљно је описана контрола квалитета чврсте LJ подлоге.

5.1.3.1. Боја подлоге

Ако су подлоге из исте серије различите боје (различите нијансе зелене боје), могући узорци су недовољно добро мешање састојака подлоге пре разливања или присуство нечистоће у епруветама. Тамнозелена боја подлога указује на већу количину малахит зеленог од прописане или на низак рН подлоге. Подлоге су бледе, жућкасте, ако је додат раствор малахит зеленог лошег квалитета или ако је висок рН подлоге. Промена боје подлоге може настати и услед коагулације на температури вишој од препоручене.

5.1.3.2. Конзистенција подлоге

Насумице изабрати једну до две подлоге из серије. Помоћу езе испитати конзистенцију подлоге. Ако је подлога исувише мека, разлог може бити недовољно висока температура коагулације.

5.1.3.3. Влажност подлоге

На дну косине подлоге уобичајено постоји мала количина кондензоване воде. Уколико је та количина велика, разлог може бити хлађење подлога након коагулисања у чврсто затвореним епруветама или неодговарајући састав подлоге.

Уколико епрувете у току чувања подлоге нису добро затворене, долази до сушења подлоге и то се јасно уочава на косини.

5.1.3.4. Хомогеност подлоге

Подлоге са мехурићима и громуљницама нису одговарајућег квалитета. Мехурићи настају услед коагулисања подлога на вишим температурама, а громуљице услед неравномерног мешања састојака подлоге.

5.1.3.5. Стерилност подлоге

Стерилност подлоге проверава се инкубирањем 1-3% подлога из сваке серије разливених подлога на 37°C током 24 сата. Ако нема пораста, разливене подлоге могу се користити за засејавање. Препоручује се да се настави инкубирање ових контролних подлога на 37°C током следеће три недеље. Резултати ове контроле стерилности подлога потребни су за тумачење резултата пораста микобактерија на засејаним подлогама.

5.1.3.6. Фертилност (осетљивост) подлоге

За контролу фертилности, способности доброг пораста микобактерија на подлози, препоручује се испитивање раста следећих референтних сојева микобактерија: *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981, *M. intracellulare* ATCC 13950 и *M. fortuitum* ATCC 2841. Имајући у виду проблем набавке и одржавања већег броја референтних сојева микобактерија, контрола фертилности LJ под-

логе треба да обухвати најмање примену *M. tuberculosis* H37Ra и *M. fortuitum* ATCC 2841. Ако лабораторија није у могућности да набави референтне сојеве микобактерија, могу се користити лабораторијске културе *M. tuberculosis* и *M. fortuitum*, које су идентификоване молекуларним тестом. За контролу селективности може се користити сој *Escherichia coli* ATCC 25922. С обзиром на састав LJ подлоге, пораст *E. coli* требало би да буде делимично инхибиран.

Поступак:

- Припремити суспензију контролног соја у стерилној дестилованој води до концентрације McFarland 1 и затим низ десетоструких разблажења до 10^{-4}
- По 0,2 мл суспензије разблажења 10^{-4} засејава се на 1-3% подлога из сваке серије. Подлоге се инкубирају на 37°C током једне недеље за *M. fortuitum* и током три недеље за *M. tuberculosis*.
- Пораст на подлогама контролисати једном недељно и бележити број пораслих колонија. Континуирано вршити праћење резултата контроле фертилности подлога. Број пораслих колонија не сме да варира више од 20% у различитим серијама разливених подлога.

Према препорукама Европског центра за превенцију и контролу болести (ECDC), за комерцијалне готове подлоге није обавезна контрола стерилности и фертилности, под условом да су доступни сви подаци о контроли квалитета подлога коју је спровео произвођач (датум производње подлоге, број лота, датум истека рока; референтни сојеви коришћени за контролу квалитета; резултати контроле квалитета подлога). Ако такви подаци нису доступни, као и ако постоји сумња да су услови транспорта и складиштења подлога неадекватни, треба извршити контролу и ових подлога применом описаног протокола.

5.2. Засејавање хранљивих подлога

Засејавање подлога треба изводити уз строго поштовање свих правила асептичног рада у циљу спречавања контаминације. Ако је на дну косине

хранљиве подлоге присутна кондезована вода, треба је одстранити пре засејавања. На сваку косину подлоге требало би инокулисати 0,1-0,2 мл (2 до 4 капи или 2 до 4 омче езе) седимента и распоредити га равномерно по целој површини. За засејавање се препоручују Пастерове пипете за једнократну употребу, могу се користити и жичане езе или езе за једнократну употребу.

Сувише мали инокулум може бити разлог за лажно негативне резултате. Ако се седимент засеје само на горњи део косине, где је подлога танка и брзо се исушује, микобактерије неће расти и издаће се лажно негативни резултат културе.

Сваки узорак требало би засејати на две LJ подлоге, а у подручјима где се изолује и *M. bovis*, треба додати и подлогу која садржи пируват.

На течне подлоге се засејава 0,5 мл седимента. Засејавање течних подлога треба изводити уз строго поштовање свих правила асептичног рада у циљу спречавања контаминације. Течне подлоге су осетљивије на контаминацију од чврстих и зато им се увек додају антибиотици који делују на контаминанте.

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 обезбедила 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.

5.3. 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 промениле 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 засејавања, 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 засејавања, 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.

5.4. Идентификација микобактерија

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 (НТМ) које се лакше емулгују. На микроскопском препарату обојеном по Ziehl-Neelsenu за бацил ТБ типично је груписање у облику завијене ужади („cord“ формација) различите дужине. Међутим, стварање „cord“ формација није својство само бацила ТБ. Неке НТМ 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. Не постоји ниједан

појединачан тест који ће диференцирати *M. tuberculosis* од осталих микобактерија. Тестовима који ће бити описани у наставку, када се употребе у комбинацији са претходно описаним културелним и микроскопским карактеристикама, може се идентификовати већина сојева *M. tuberculosis*.

Међутим, треба имати у виду да је захтев савремене микобактериолошке дијагностике идентификација изолованих култура микобактерија до нивоа комплекса/врсте у трајању од 24 до 48 сати. Само за сојеве идентификоване као *M. tuberculosis* ради се тест испитивања осетљивости на антитуберкулозне лекове. Стога је актуелна препорука примена брзих техника за идентификацију изолованих култура микобактерија. Ове технике описане су у Поглављу 7., одељку 7.3. За идентификацију *M. tuberculosis* комплекса препоручује се примена имунохроматографских и молекуларних тестова, а за идентификацију НТМ молекуларне технике, које омогућавају поуздану и прецизну идентификацију микобактерија до нивоа врсте.

5.4.1. 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 ретки. 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 време створе довољно нијацина да би се могло доказати његово присуство.

Поступак

- На културу бактерија налити 1 мл 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 целу површину подлоге.
- Оставити 60-90 минута за екстракцију нијацина.

- Пипетом пренети 0,5 мл течног екстракта у епрувету са навојем, оставити да стоји још 30 минута.
- У епрувете постепено додати по 0,2 мл 1% калијум-цијанида (KCN) и 0,2 мл 5% хлорамина.
- Реакција се чита након 5 минута, а појава жуте боје указује на позитивну реакцију.
- Додати 2 до 3 мл 4% NaOH и аутоклавирати.

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

Реагенси:

1% KCN (1г KCN + 99 мл стерилне дестиловане воде)

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

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

6.4.2. Тест редукције нитрата

M. tuberculosis је један од најјачих редуктора нитрата међу микобактеријама. То омогућава коришћење овог теста у комбинацији са нијацинским тестом у диференцијацији *M. tuberculosis* од других микобактерија. Културе које ће се тестирати на редукцију нитрата треба да буду старе 4 недеље и препоручује се LJ подлога са обилним порастом.

Поступак

- У епрувету са затварачем на завртањ сипати 0,2 мл стерилног физиолошког раствора.
- Езом суспендовати пуну омчу колонија 4 недеље старе културе.
- Додати 2 мл NaNO₃ супстрата.
- Добро промућкати и инкубирати у термостату 1 сат на 37°C у усправном положају.
- Додати: једну кап реагенса А, две капи реагенса Б и две капи реагенса В.

Тест је позитиван ако је реакција од ружичасте до тамноцрвене боје:

- бледоружичасто = +/-
- јасноружичасто = 1+
- тамноружичасто = 2+
- црвено = 3+
- тамноцрвено = 4+
- пурпурноцрвено = 5+

Негативна реакција: нема промене боје.

У све епрувете са негативном реакцијом треба додати мало цинка у праху:

- а) ако се појави црвена боја након додавања цинка, значи да је негативно читавање било исправно;
- б) ако се боја не развије, оригинална реакција је била позитивна, али су нитрати редуковани даље до нитрита; тест треба поновити.

Контроле:

- негативна контрола – неинокулисана подлога.
- позитивна контрола – *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

Реагенси

Супстрат натријум-нитрата у пуферу:

KH_2PO_4 3,02 г

дестилована вода 1000 мл

Растворити калијум-фосфат у дестилованој води да се добије 0,022 М раствор ⇒ раствор 1.

Na_2HPO_4 3,16 г

дестилована вода 1000 мл

Растворити натријум-фосфат у дестилованој води да се добија 0,22 М раствор ⇒ раствор 2.

389 мл раствора 1, дати 611 мл раствора 2 и добро промешати; проверити да ли је рН 7,0 ⇒ раствор 3.

Комплетан натријум-нитратсупстрат пуфер се добија на следећи начин:

NaNO ₃	0,85 г
раствор 3	1000 мл

Растворити натријум-нитрат у пуферу и разлити у боце по 100 мл. Стерилисати аутоклавирањем на 121°C 15 минута.

Реагенс А: раствор хлороводоничне киселине

концентрирана HCl	10 мл
дестилована вода	10 мл

Полако додати концентровану HCl у дестиловану воду (никада обрнуто) да се добије раствор 1:1. Чувати у тамним боцама у фрижидеру.

Реагенс Б: раствор сулфаниламида 0,2 %

сулфаниламид	0,2 г
дестилована вода	100 мл

Раствор чувати у тамним боцама у фрижидеру.

Реагенс В: Н-нафтилетилен-диамин 0,1 %

Н-нафтилетилен-диамин	0,1 гр
дестилована вода	100 мл.

5.4.3. Каталаза тест након загревања култура на 68°C

Поступак

- У епрувету 16x160 мм са затварачем на навој асептично додати стерилном пипетом 0,5 мл 0,067 М фосфатног пуфера рН 7,0.
 - Користећи стерилну езу суспендовати пуну езу културе и ставити у водено купатило претходно загрејано на 68°C, 20 минута.
 - Извадити епрувете и оставити да се охладе на собној температури.
 - У сваку епрувету додати 0,5 мл свеже припремљене мешавине Tween-пероксида; одврнути затвараче.
 - Посматрати формирање мехурића који се појављују на површини течности (не мућкати епрувете јер Tween80 такође може да ствара мехуриће кад се мућка дајући лажно позитиван резултат).
- Задржати негативне епрувете 20 минута пре одбацивања.

Овај тест је увек негативан код *M. tuberculosis*. Позитиван тест указује на микобактерије које не припадају *M. tuberculosis* комплексу.

Контроле:

- негативна контрола – неинокулисана подлога;
- позитивна контрола – *M. fortuitum*.

Реагенси:

10% Tween80 (1 мл Tween80 + 9 мл дестиловане воде):

- помешати Tween80 са дестилованом водом и аутоклавирати на 121°C 10 минута;
- раствор чувати у фрижидеру.

30% водоник пероксид (H_2O_2)

Непосредно пре употребе помешати једнаке делове 10% Tween80 и 30% H_2O_2 .

5.4.4. Раст на подлози са п-нитробензоичном киселином

Идентификација бацила туберкулозе може се извршити на основу пораста на подлози са п-нитробензоичном киселином (ПНБ) у комбинацији са претходно поменутиим тестовима. Инокулишу се две LJ подлоге, једна која садржи глицерол и једна подлога која садржи п-нитробензоичну киселину (ПНБ) у концентрацији 500 мг/л. *M. tuberculosis* не расте на LJ подлози са ПНБ.

Критеријуми за идентификацију *M. tuberculosis* :

- расте споро;
- расте на температури од 35-37°C;
- не продукује пигмент;
- нијацински тест је позитиван;
- позитиван је тест редукције нитрата;
- негативан каталаза тест након загревања културе на 68°C;
- не расте на LJ подлози са ПНБ.

5.5. Издавање резултата култивисања

Прелиминарни резултат култивисања треба издати као позитиван, негативан или контаминација. За позитивне културе треба извести и о тачном броју колонија и извршити градирање налаза (Табела 6.1.).

Табела 6.1. Извештај култивисања

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

- Ако су културе контаминирани, одмах послати извештај лекару и тражити нови узорак болесничког материјала.
- Резултат позитивне културе издати одмах као прелиминарни извештај „Изоловани ацидоалкохолорезистентни бацили. Идентификација у току“.
- Крајњи извештај издати након завршене идентификације културе микобактерија.

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

6. ИСПИТИВАЊЕ ОСЕТЉИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЈА НА АНТИТУБЕРКУЛОТИКЕ

Испитивање осетљивости *Mycobacterium tuberculosis* на антитуберкулотике прве линије треба радити од првих изолата пре започињања лечења. Ако болесник после 2 до 3 месеца лечења и даље има позитивне културе, треба поновити испитивање осетљивости тих култура. Када се докаже да је изолат резистентан, мења се режим лечења у складу са смерницама Националног програма за контролу туберкулозе (ТБ).

Дефинисани су различити облици резистенције *M. tuberculosis* на антитуберкулотике:

- монорезистенција – резистенција на један антитуберкулотик прве линије;
- полирезистенција – резистенција на два или више антитуберкулотика прве линије;
- мултирезистенција (MDR – multidrug resistant) – специфичан облик полирезистенције, односно резистенција на изониазид и рифампицин, са резистенцијом или без резистенције на друге антитуберкулотике прве линије;
- примарна резистенција – резистенција соја *M. tuberculosis* изолованог од болесника који претходно није лечен антитуберкулотикама; последица је преноса резистентног соја бацила ТБ са другог болесника;
- стечена резистенција – резистенција настала током лечења антитуберкулотикама, које је трајало најмање један месец и подразумева да је сој изолован из узорка узетог пре почетка лечења био осетљив; последица је акумулације мутација током субоптималног терапијског режима.

Конвенционалне методе за испитивање осетљивости бацила ТБ заснивају се на детекцији раста на чврстим хранљивим подлогама које садрже

антитуберкулотике. Стандардизоване су три методе:

- метод пропорције,
- метод апсолутне концентрације и
- метод односа резистенције (упоређивање резистенције изолованог соја са стандардним сојем *M. tuberculosis* H37Rv).

Највише се користи **метод пропорције**, који се заснива на одређивању процента резистентних бацила од укупне популације испитиваног изолата. Критична пропорција је 1%. Изолат *M. tuberculosis* је резистентан на испитивани лек ако 1% или више од 1% бацила од укупне популације расте на подлогама са одређеним концентрацијама лека (критична концентрација). За испитивање осетљивости бацила ТБ на антитуберкулотике користи се Löwenstein-Jensenova (LJ) подлога модификована од стране Међународног удружења за борбу против ТБ и плућних болести (IUATLD). Ова модификована подлога означава се као IUTM (International Union Against Tuberculosis Medium). Осетљивост изолата бацила ТБ испитује се на следеће критичне концентрације лекова:

- изониазид (H) 0,2 µг/мл;
- рифампицин (R) 40,0 µг/мл;
- етамбутол (E) 2,0 µг/мл;
- стрептомицин (S) 4,0 µг/мл;
- пипразинамид - испитивање осетљивости на овај лек на LJ подлози представља технички проблем, те се препоручује тестирање са никотинамидом (1000 µг/мл). Испитивање осетљивости на пипразинамид ради се само на течним подлогама.

Тест за испитивање осетљивости на антитуберкулотике друге линије треба да се ради у лабораторијама у којима се годишње детектује 200 резистентних сојева или 50 болесника са резистентном ТБ. Начелно, тест изводе националне лабораторије развијених земаља, односно супранационалне референтне лабораторије (СРЛ) за потребе лабораторија са малим бројем резистентних изолата. Испитивање осетљивости на антитуберкулотике друге линије за MDR изолате из Србије, ради СРЛ у Борстелу у Немачкој.

Испитивање осетљивости нетуберкулозних микобактерија на лекове

још увек се не ради у рутинској микобактериолошкој дијагностици у мрежи лабораторија у Србији.

6.1. Припремање подлога са антитуберкулотима

Користити само **чисту супстанцу антитуберкулотика** поузданог порекла (познати произвођач и добављач). Лекови се чувају у складу са препоруком произвођача, једну до две године:

- изониазид и етамбутол на собној температури (најбоље у десикатору са силика гелом јер је етамбутол хигроскопан),
- стрептомицин у фрижидеру на $+4^{\circ}\text{C}$ и
- рифампицин се замрзава на -20°C .

За припрему основних раствора, чисте супстанце лекова одмерене на аналитичкој ваги, растварају се у стерилној дестилованој води, осим рифампицина који се раствара у пропилен-гликолу или метанолу или диметилсулфоксиду (ДМСО). За даља разблажења лекова користи се дестилована вода.

6.1.1. Припремање раствора антитуберкулотика

- припремити растворе лекова:
 - изониазид 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 - рифампицин 4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 - етамбутол 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 - стрептомицин 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- чување раствора антитуберкулотика:
 - 1 недеља на $+4^{\circ}\text{C}$;
 - 6 месеци на -20°C : замрзнути у епруветама по 1 мл раствора; ако се после одмрзавања раствор не потроши, не треба га поново замрзавати;
 - ако у лабораторији не постоји замрзивач на -20°C , растворе треба припремити непосредно пре прављења подлога за тест резистенције.

6.1.1.1. Раствор изониазида

Раствор I: 10 мг изониазида растворити у 50 мл стерилне дестиловане воде → 200 µг/мл

Раствор II: 2,5 мл раствора I додати у 22,5 мл стерилне дестиловане воде → 20 µг/мл

Раствор III: 5 мл раствора II додати у 5 мл стерилне дестиловане воде → 10 µг/мл

Раствор I (200 µг/мл) може се замрзнути на -20°C .

6.1.1.2. Раствор рифампицина

Раствор I: 40 мг рифампицина растворити у 10 мл 95% метанола → 4000 µг/мл

Раствор II: 2,5 мл раствора I растворити у 7,5 мл стерилне дестиловане воде → 1000 µг/мл

6.1.1.3. Раствор етамбутола

Раствор I:

13,6 мг етамбутол-дихидрохлорида растворити у 50 мл стерилне воде → 200 µг/мл

Раствор II:

5 мл раствора I додати у 15 мл стерилне дестиловане воде → 50 µг/мл

Раствор I (200 µг/мл) може се замрзнути на -20°C .

Напомена

Чиста супстанца је у облику етамбутол-дихидрохлорида.

136 мг етамбутол-дихидрохлорида одговара 100 мг етамбутола, 13,6 мг етамбутол-дихидрохлорида одговара 10 мг етамбутола (10 мг \times 1,36 = 13,6 мг етамбутол-дихидрохлорида).

6.1.1.4. Раствор стрептомицина

За припрему раствора стрептомицина користи се чиста супстанца дихидрострептомицин-сулфата. Активност стрептомицина варира од 660 мг/г до 800 мг/г и увек је назначена на паковању лека. Ако је, нпр. за

прављење раствора потребан 1 г стрептомицина, а активност стрептомицина у дихидрострептомицин-сулфату 780 мг/г, потребно је измерити 1,28 г дихидрострептомицин-сулфата ($1:0,780=1,28$).

Раствор I:

5,12 мг дихидрострептомицин-сулфата растворити у 10 мл стерилне воде → 400 µг/мл

Раствор II:

10 мл раствора I додати у 10 мл стерилне дестиловане воде → 200 µг/мл
Раствор I (400 µг/мл) може се замрзнути на -20°C .

Напомена ако је активност стрептомицина 780 мг/г:

128 мг дихидрострептомицин-сулфата одговара 100 мг стрептомицина;
 $4 \text{ мг} \times 1,28 = 5,12 \text{ мг}$ дихидрострептомицин-сулфата.

6.1.2. Додавање антитуберкулотика у подлогу

- Припремити 1440 мл LJ подлоге.
- Разлити подлогу у 4 боце по 198 мл, у једну од 400 мл (за контролу, тј. LJ без лека) и у 12 боца по 19,8 мл (за одређивање МИК за контролни сој *M. tuberculosis* H37Rv).
- Додати по 2 мл раствора антитуберкулотика у боце од по 198 мл LJ подлоге. Следи упуство за припрему подлога за одређивање МИК контролног соја. Упуство је дато у табелама (Табеле 6.1. до Табеле 6.4.).
- Растворе лекова добро помешати са подлогом; разлити по 6 мл подлоге у епрувете 16×160 мм.
- Подлоге коагулисати у уклошеном положају у коагулатору на 85°C у току 30-40 минута.
- Подлоге са лековима чувати на 4°C , најдуже до месец дана.

Табела 6.1. Концентрације изониазида у подлогама за тест резистенције и контролу квалитета (µг/мл)

	Критична концентрација	Концентрације за одређивање МИК		
	0, 2 µг/мл	0,1 µг/мл	0,05 µг/мл	0,025 µг/мл
ЛЈ подлога (мл)	198	19,8	19,8	19,8
Раствор II (мл)	2	–	–	–
Раствор III (мл)	–	0,2	0,10	0,05
Вода (мл)	–	–	0,10	0,15
Укупна запремина (мл)	200	20	20	20

Табела 6.2. Концентрације рифампицина у подлогама за тест резистенције и контролу квалитета (µг/мл)

	Критична концентрација	Концентрације за одређивање МИК		
	40 µг/мл	10 µг/мл	5 µг/мл	2,5 µг/мл
ЛЈ подлога (мл)	198	19,8	19,8	19,8
Раствор I (мл)	2	–	–	–
Раствор II (мл)	–	0,2	0,10	0,05
Вода (мл)	–	–	0,10	0,15
Укупна запремина (мл)	200	20	20	20

Табела 6.3. Концентрације етамбутола у подлогама за тест резистенције и контролу квалитета (µг/мл)

	Критична концентрација	Концентрације за одређивање МИК		
	2 µg/ml	0,5 µг/мл	0,25 µг/мл	0,125 µг/мл
ЛЈ подлога (мл)	198	19,8	19,8	19,8
Раствор I (мл)	2	–	–	–
Раствор II (мл)	–	0,2	0,10	0,05
Вода (мл)	–	–	0,10	0,15
Укупна запремина (мл)	200	20	20	20

Табела 6.4. Концентрације стрептомицина у подлогама за тест резистенције и контролу квалитета (µг/мл)

	Критична концентрација	Концентрације за одређивање МИК		
	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml
ЛЈ подлога (мл)	198	19,8	19,8	19,8
Раствор I (мл)	2	–	–	–
Раствор II (мл)	–	0,2	0,10	0,05
Вода (мл)	–	–	0,10	0,15
Укупна запремина (мл)	200	20	20	20

6.2. Бактеријска суспензија

Бактеријска суспензија се прави од колонија са примарне културе или са супкултуре. За тест резистенције култура мора бити чиста и у фази активног раста. Тест резистенције треба радити једну до две недеље после

појаве видљивог раста. Када је мали број колонија, мањи од 5, тест резистенције није репрезентативан и не треба га радити за такве културе. Ако је култура са малим бројем колонија једина од које се може урадити тест резистенције, тада у резултат теста обавезно унети тачан број колонија од којих је урађен тест.

Супкултивисање је обавезно:

- када примарна култура није чиста (на препарату са културе поред ацидоалкохолорезистентних бацила, АРБ, присутни су и контаминанти);
- када је мали број колонија за прављење бактеријске суспензије;
- када је фаза активног раста бактерија завршена тј. ако је култура старија од 4 недеље.

6.2.1. Припрема бактеријске суспензије:

- Стерилном езом промера 3 мм (једна пуна еза је око 1 мг бактеријске масе) скинути колоније са 5 различитих места са површине културе испитиваног соја; бактеријску масу пренети у епрувету 20×100 мм, у којој се налазе стерилне перле и две капи стерилне дестиловане воде.
- Хомогенизовати суспензију на вортексу, додати неколико милилитара стерилне дестиловане воде и оставити да стоји 10 минута, да би се велике партикуле исталожиле.
- Супернатант пренети у другу епрувету, додавати дестиловану воду, поредити суспензију бактерија са McFarland стандардом 1 (суспензија баријум-сулфата = 9,9 мл 1% сумпорне киселине + 0,1 мл 1% раствора баријум-хлорида; ова суспензија се пре сваке употребе мора добро промућкати; сваког трећег месеца треба припремити свежу суспензију баријум-сулфата).
- Од припремљене суспензије (1 мг/мл) направити десетострука разблажења бактеријске суспензије.

6.2.2. Разблажења бактеријске суспензије

Од припремљене суспензије (1 мг/мл) са дестилованом водом прави се инокулум за засејавање: 10^{-2} (0,01 мг/мл) и 10^{-4} (0,0001 мг/мл).

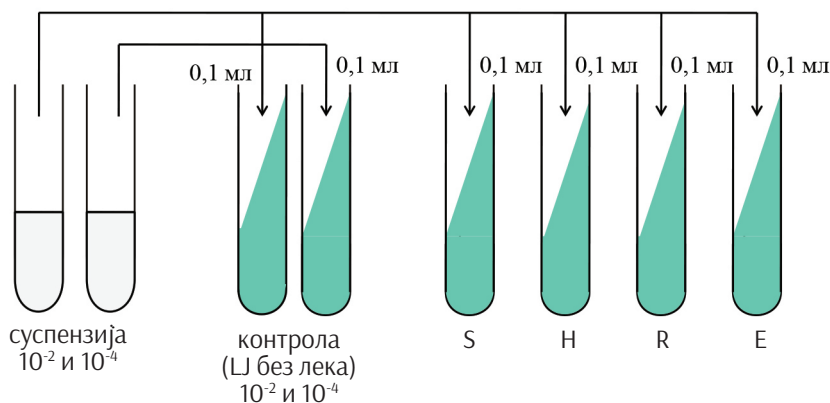
Табела 6.5. Разблажења бактеријске суспензије

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
1 мл бактеријске суспензије McFarland 1	1 мл бактеријске суспензије 10^{-1}	1 мл бактеријске суспензије 10^{-2}	1 мл бактеријске суспензије 10^{-3}
9 мл дестиловане воде	9 мл дестиловане воде	9 мл дестиловане воде	9 мл дестиловане воде

6.3. Засејавање бактеријске суспензије

Пипетом се најпре засејавају подлоге без лекова (контроле) са 0,1 мл суспензије 10^{-2} и 10^{-4} , а након тога се суспензијом 10^{-2} засејавају подлоге са уграђеним лековима (Схема 6.1.)

Схема 6.1. Засејавање бактеријске суспензије



S - стрептомицин, H - изониазид, R - рифампицин, E - етамбутол

6.4. Читање теста резистенције

Резултати теста за испитивање осетљивости бацила ТБ на антитуберкулозику издају се:

- након инкубације од 4 недеље на 37°C, а након 6 недеља ако нема пораста на контроли; ако и после тог времена нема пораста на контроли, тест треба поновити;
- ако је на контроли са суспензијом 10^{-4} порасло 30-100 колонија.

Зависно од пораста испитиваног соја на подлози са уграђеним леком, у поређењу са порастом соја на контролама без лека, сој је (Табела 6.6.):

- осетљив (сензитиван – S) - ако нема пораста на подлогама са уграђеним лековима;
- резистентан (R) - ако је пораст на подлози са леком једнак или већи од пораста на подлози без лека засејаној бактеријском суспензијом 10^{-4} .

Напомена:

- Ако је број колонија на контроли са суспензијом 10^{-4} мањи од 20, могу се прихватити резултати теста само ако је сој резистентан. Ако је сој осетљив, издати прелиминарни резултат са напоменом да тест за испитивање осетљивости треба поновити.
- Ако је вредност минималне инхибиторне концентрације (МИК) за контролни сој веома ниска, резултат да је испитивани сој осетљив не може се прихватити.
- Ако је вредност МИК за контролни сој вишеструко већа, резултат да је испитивани сој резистентан не може се прихватити.

Табела 6.6. Тумачење теста за испитивање осетљивости на антитуберкулотике

Лек	МИК (µг/мл) за H37Rv	Критична концентрација (µг/мл)	Критична пропорција (%)	Пораст испитиваног соја на подлози са критичном концентрацијом лека	
				осетљив (S)	резистентан (R)
H	0,06	0,2	1	нема пораста	пораст је једнак или већи од пораста на контроли 10 ⁻⁴
R	4,0	40,0	1		
E	0,5	2,0	1		
S	2,0	4,0	1		

H - изониазид, R - рифампицин, E - етамбутол, S - стрептомицин

6.5. Контрола квалитета теста резистенције

Приликом сваког извођења теста резистенције, поред клиничких изолата треба укључити и 3 контролна соја: *M. tuberculosis* H37Rv и 2 лабораторијска изолата *M. tuberculosis* са познатим профилима резистенције. Изабрани лабораторијски контролни сојеви не треба да буду мултирезистентни. Контролне сојеве тестирати под истим условима као и клиничке изолате, односно на подлогама са критичним концентрацијама лекова. *M. tuberculosis* H37Rv је осетљив на сва 4 лека. О резултатима ових контрола водити редовну евиденцију.

За контролу сваке нове серије подлога са антитуберкулотима потребно је одредити МИК за *M. tuberculosis* H37Rv. Истовремено када се припремају подлоге са критичним концентрацијама лекова, треба припремити и серије подлога са разблажењима лека за одређивање МИК за контролни сој (Табеле 6.1. – 6.4.). Припрема инокулума је идентична као за испитивани (болеснички) сој. Од суспензије (1 мг/мл) праве се десетострука разблажења са дестилованом водом и по 0,1 мл суспензије 10⁻² (0,01 мг/мл) засејава се на сваку подлогу са леком.

Вредности МИК за *M. tuberculosis* H37Rv су: 4 µг/мл за рифампицин, 0,06 µг/мл за изониазид, 0,25 µг/мл за етамбутол и 1 µг/мл за стрептомицин (Табела 6.6.). Концентрације рифампицина и изониазида у подлогама за испитивање МИК нису идентичне вредностима МИК за ова два лека соја *M. tuberculosis* H37Rv. МИК за рифампицин је 4 µг/мл, а концентрација лека је 5 µг/мл. МИК за изониазид је 0,06 µг/мл, а концентрација лека је 0,05 µг/мл. Доказано је да су ова неслагања прихватљива за рутинско тестирање вредности МИК, а примена оваквих приближних концентрација знатно олакшава припрему подлога са лековима за извођење контроле квалитета. Упутство за тумачење резултата контроле квалитета теста резистенције, односно одређивања вредности МИК контролног соја *M. tuberculosis* H37Rv дато је у Табели 6.7.

Табела 6.7. Тумачење резултата одређивања вредности МИК контролног соја *M. tuberculosis* H37Rv

Лек	µг/мл	Раст H37Rv	µг/мл	Раст H37Rv	µг/мл	Раст H37Rv
Изониазид	0,1	∅	0,05	∅	0,025	+
Рифампицин	10	∅	5	∅	2,5	+
Етамбутол	0,5	∅	0,25	∅	0,125	+
Стрептомицин	2	∅	1	∅	0,5	+

7. БРЗА ЛАБОРАТОРИЈСКА ДИЈАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛОЗЕ

Лабораторијска потврда дијагнозе туберкулозе (ТБ) применом техника конвенционалне микобактериолошке дијагностике је веома дуготрајан поступак. Са изузетком резултата микроскопског прегледа директног препарата, сви остали резултати доступни су лекарима клиничарима тек након више недеља. Имајући у виду да је брзо и поуздано откривање ТБ применом микробиолошке дијагностике један од основа програма контроле ове болести, јасно је да је примена техника брзе лабораторијске дијагностике од веома великог значаја. Брза лабораторијска дијагностика данас постаје све важнија и у дијагностици инфекција изазваних нетуберкулозним микобактеријама (НТМ), чији је клинички значај у јасном порасту.

Током неколико последњих деценија дошло је до знатних помака у области лабораторијске медицине, тако да је развијен и велики број техника за брзу микобактериолошку дијагностику. Према стандардима модерне лабораторијске дијагностике ТБ у Европи, присуство *M. tuberculosis* у узорцима спутума мора бити доказано у оквиру 21 дана од пријема материјала, а изолована култура микобактерија треба да се идентификује за један до два радна дана. Свакако да и у нашој земљи постоји интерес да се квалитет лабораторијске дијагностике ТБ усклади са овим стандардима. Кључни сегменти брзе дијагностике инфекција изазваних микобактеријама, који су доступни у оквиру мреже лабораторија за дијагностику ТБ у Србији су:

- директна детекција присуства и осетљивости на рифампицин и изониазид *M. tuberculosis* у клиничким узорцима применом молекуларних техника;
- култивисање микобактерија у течним подлогама са различитим осетљивим системима за рану детекцију пораста ових бактерија;
- брза идентификација изолованих култура микобактерија применом имунохроматографских есеја и молекуларних техника;

- испитивање осетљивости изолованих култура бацила ТБ на рифампицин и изониазид применом брзих техника.

У тексту који следи укратко су представљени основни принципи, најважније техничке карактеристике и оквирне смернице за практичну примену наведених техника брзе дијагностике.

7.1. Директна детекција присуства и осетљивости *M. tuberculosis* у клиничким узорцима

Највећи број данас доступних техника за директну детекцију присуства *M. tuberculosis* у узорцима без култивисања, засноване су на амплификацији кратких секвенци нуклеинских киселина ове бактерије. За ту намену развијени су различити стандардизовани комерцијално доступни формати тестова, који се изводе као мануелни есеји или у полуаутоматизованим и аутоматизованим системима.

Пример аутоматизованог система, који се данас веома много и широко користи, је Хpert МТВ/РИF assay, Cepheid GeneХpert System (Cepheid). У питању је систем који омогућава осетљиву и специфичну детекцију присуства бацила ТБ и резистенције на рифампицин у клиничким узорцима. Потрошни материјал су пластични кертрици који садрже све реагенсе потребне за лизу ћелијског зида микобактерија, екстракцију ДНК, РСР амплификацију и детекцију ампликона. Све процедуре, од припреме узорка до анализе ампликона, потпуно су аутоматизоване. Мануелни рад подразумева само додавање пуфера за лизу клиничком узорку и улагање кертрица у апарат, тако да руковање не захтева сложену обуку и посебна знања. Основна намена Хpert МТВ/РИF је брзо откривање ТБ и брза диференцијација ТБ осетљиве на лекове од мултирезистентне ТБ (multidrugresistant, МДР), јер се резистенција на рифампицин сматра маркером мултирезистенције. У питању је несумњиво одличан дијагностички систем, али са врло јасним препорукама за примену. Хpert МТВ/РИF треба користити: у популацијама са високим вредностима преваленције и инциденције МДР ТБ; у популацијама у којима је висока учесталост коинфекције бацилом ТБ и вирусом хумане имунодефицијенције (ХИВ); и у

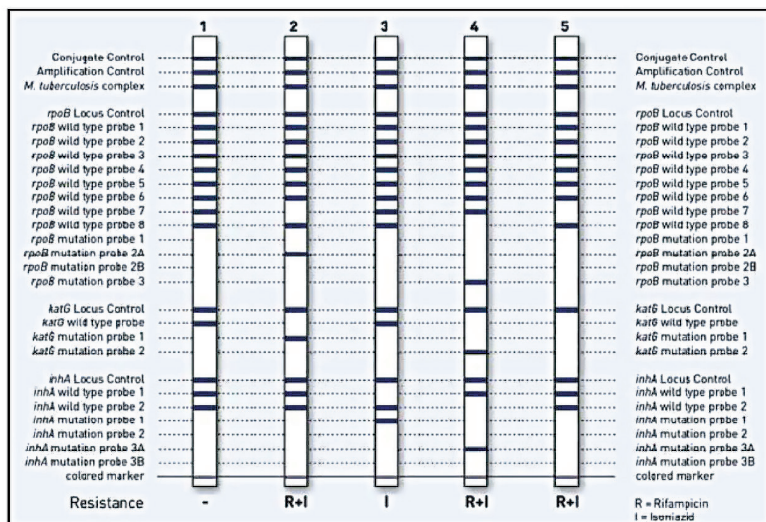
земљама које немају развијену инфраструктуру лабораторија за дијагностику ТБ односно у земљама у којима не постоје могућности за култивисање микобактерија и тест испитивања осетљивости на антитуберкулозне лекове. Потпуно је јасно да ситуација у Србији не одговара ниједном од наведених критеријума. Поред тога, у нашој земљи је доказано изоловање сојева бацила ТБ који су монорезистентни на рифампицин, али нису мултирезистентни.

У мрежи лабораторија за дијагностику ТБ у Србији се за директно доказивање присуства и испитивање осетљивости бацила ТБ у клиничким узорцима користи GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience), у складу са препорукама СЗО и Европског центра за превенцију и контролу болести (ECDC). У питању је молекуларни тест који омогућава симултану идентификацију *M. tuberculosis* комплекса и детекцију резистенције на рифампицин и изониазид. Тест се препоручује за микроскопски негативне и позитивне респираторне узорке. Примена овог теста омогућава да се за неколико сати утврди да ли је у узорку присутан бацил ТБ и, ако јесте, да ли је осетљив на рифампицин и изониазид. У том смислу, овај тест пружа драгоцену могућност брзог и ефикасног откривања МДР ТБ. Велики број студија потврдио је одличан квалитет GenoType® MTBDRplus теста. Вредност осетљивости за детекцију резистенције на рифампицин у микроскопски позитивним узорцима спутума је 98,9%, а специфичности 99,4%. Када је у питању детекција резистенције на изониазид, осетљивост је 94,2%, а специфичност 99,7%. Наведене вредности осетљивости и специфичности GenoType® MTBDRplus теста одређене су у поређењу са резултатима добијеним применом пропорционалног метода на Lowenstein Jensen (LJ) подлози.

Први корак у извођењу овог теста је изолација ДНК, за коју се према упутствима произвођача користи једноставан протокол. Следећа фаза је амплификација реакцијом ланчане полимеразе (polymerase chain reaction, PCR) специфичних циљних секвенци, у којима су присутне најважније мутације одговорне за појаву резистенције на рифампицин и изониазид. Испитивање резистенције на рифампицин заснива се на детекцији најзначајнијих мутација у оквиру *rpoB* гена. У циљу откривања резистенције на

изониазид испитују се мутације у оквиру *katG* и *inhA* гена. Прајмери који се користе у овој мултиплекс PCR реакцији обележени су биотином, што практично значи да су и добијени PCR производи већ обележени. Након хемијске денатурације добијених PCR произуката, следи реверзна хибридизација, односно хибридизација обележених PCR произуката са пробама које су имобилисане на мембрани. Hain Lifescience је за ову фазу поступка развио посебан уређај, TwinCubator®, који је оптимизован за потребе свих GenoType® тестова, а истовремено функционише и као водено купатило и као платформа за хибридизацију. После завршене реверзне хибридизације и визуелизације резултата, односно након појаве тамно обојених линија на местима где је дошло до реакције хибридизације, изводи се интерпретација резултата у складу са упутствима произвођача теста (Слика 7.1.).

Слика 7.1. Пример тумачења резултата GenoType® MTBDRplus теста за доказивање присуства бацила ТБ и испитивање осетљивости на рифампицин и изониазид



Брзу молекуларну детекцију присуства и осетљивости бацила ТБ у клиничким узорцима требало би радити код свих микроскопски пози-

тивних пацијената, као и код микроскопски негативних пацијената када за то постоје специфичне индикације. Међутим, овакав обим примене молекуларних тестова још увек није могућ у нашој земљи. Стога су дефинисане следеће кључне ситуације у којима лекари микробиолози, у сарадњи са лекарима клиничарима, треба да пошаљу узорке на молекуларни тест детекције присуства бацила ТБ и испитивања осетљивости на рифампицин и изониазид:

1. микроскопски позитиван респираторни узорак од сваког пацијента за кога је доступан податак да је претходно лечен;
2. микроскопски негативан или микроскопски позитиван респираторни узорак од сваког пацијента код кога постоји сумња на ТБ, а из контакта је са МДР ТБ;
3. микроскопски позитиван респираторни узорак од сваког пацијента код кога микроскопски налаз у узорцима остаје позитиван и након два месеца лечења;
4. микроскопски позитиван респираторни узорак од сваког пацијента код кога постоји специфична медицинска (на пример, лекар процењује клинички ток као „лош“ и неадекватан одговор на примењено лечење; ХИВ серопозитивни пацијенти) и епидемиолошка индикација (на пример, боравак пацијента у земљи са високом преваленцијом МДР ТБ).

За све наведене ситуације важи следећа препорука: ако се молекуларним тестом утврди да су у респираторном узорку присутни мултирезистентни бацили ТБ, треба послати још један узорак на испитивање применом GenoType® MTBDRplus теста.

Треба свакако имати у виду да су ово минималне препоруке за примену молекуларне детекције присуства и осетљивости бацила ТБ директно у клиничким узорцима, а да је широка примена ових тестова у јасном интересу и пацијената и целокупног програма контроле ТБ.

7.2. Култивисање микобактерија у течним подлогама са осетљивим системима за рану детекцију пораста

Изоловање *M. tuberculosis* из клиничких узорака представља златни стандард за постављање дијагнозе ТБ. Изолована култура микобактерија неопходна је за даља испитивања, односно поступак идентификације и тест резистенције на антитуберкулозне лекове. Међутим, конвенционалне методе култивисања на чврстим хранљивим подлогама, као што су LJ или Middlebrook агари, захтевају више недеља за пораст видљивих колонија спорорастућих микобактерија, којима припада и бацил ТБ. Велики помак у култивисању микобактерија представљају течне подлоге са осетљивим системима за рану детекцију пораста. У мрежи лабораторија за дијагностику ТБ у Србији доступна су два типа аутоматизованих система са течним подлогама: BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System (Becton, Dickinson and Company Diagnostic Systems) и MB/BacT Mycobacteria Detection System или BacT/ALERT Microbial Detection System (bioMérieux). Поред примене у оквиру аутоматизованог система, BBL™ MGIT™ течне подлоге доступне су и за мануелно тестирање односно култивисање микобактерија и детекцију њиховог пораста без примене апарата. Постојање мануелног система који омогућава рану и осетљиву детекцију пораста микобактерија, а не захтева велика улагања, отвара могућност за увођење оваквог начина култивисања у већи број микобактериолошких лабораторија.

BBL™ MGIT™ подлога је течна подлога која садржи модификовани Middlebrook 7H9 бујон и суплемент за стимулацију раста микобактерија. С обзиром на то да је учесталост контаминације другим микроорганизмима, као и код осталих течних подлога, виша него код чврстих подлога, обавезно је додавање антимикуробне BBL™ MGIT™ PANTA смеше антибиотика и антимикотика. Компонента BBL™ MGIT™ подлоге која омогућава детекцију пораста микобактерија је комплекс кисеоника и флуорохрома фиксиран у слоју силикона на дну сваке епрувете. Веза кисеоника и флуорохрома, који садржи флуоресцентно обележени рутенијум, је таква да нема емисије флуоресценције док су у комплексу. Међутим, током рас-

та микобактерија троши се кисеоник из комплекса, изостаје инхибиција флуорохрома односно почиње емисија флуоресценције која се детектује УВ светлом. Интензитет емитоване флуоресценције директно је сразмеран количини потрошеног кисеоника односно расту микобактерија. Инокулисане BBL™ MGIT™ епрувете стављају се у апарат, који представља затворен систем за инкубирање и детекцију пораста читавањем флуоресценције на сваких 60 минута. Када интензитет флуоресценције достигне детектабилан ниво, апарат сигнализира позитивност културе. Мануелни BBL™ MGIT™ подразумева да се инокулисане епрувете инкубирају на 37°C у термостату и да се од другог дана инкубације свакодневно проверава појава пораста бактерија применом УВ лампе. Појава уочљиве флуоресценције указује на пораст бактерија у инокулисаној подлози.

VacT/ALERT® MP подлога такође садржи модификовани Middlebrook 7H9 бујон и суплемент за стимулацију раста микобактерија. Спречавање контаминације ове подлоге такође захтева додавање антимицробне смеше антибиотика и антимикотика. Принцип детекције раста микобактерија на VacT/ALERT® MP подлози је детекција угљен-диоксида, који продукују микобактерије током раста и метаболисања супстрата у подлози. Колориметријски сензор за угљен-диоксид налази се на дну сваке бочице и у присуству угљен-диоксида мења боју из плавозелене у жуту. Промену боје региструје апарат врло осетљивим системом, који мери вредности рефлектанце на сваких 10 минута.

Препорука је да се пре инокулације течних подлога изврши обрада клиничких узорака применом стандардизованог NaOH-NALC протокола. Протокол је детаљно описан у одељку 3.1.2. На BBL™ MGIT™ подлогу могу се засејавати сви клинички узорци осим узорака урина и крви, а на VacT/ALERT® MP подлогу сви клинички узорци сем узорака крви. За изоловање микобактерија из узорака крви применом аутоматизованог система MB/VacT Mycobacteria Detection System или VacT/ALERT Microbial Detection System користи се подлога VacT/ALERT® MB. Приликом употребе MB/VacT Mycobacteria Detection System или VacT/ALERT Microbial Detection System треба пратити препоруке произвођача. За примену VACTEC™ MGIT™ 960 система је, поред упутстава произвођача, доступан детаљни

приручник MGIT™ Procedure Manual (Siddiqi, S.H., Rüsç-Gerdes, S.) објављен 2006. године.

Позитиван резултат култивисања у BBL™ MGIT™ подлогама практично значи да је у подлози дошло до детектабилног пораста бактерија, највероватније микобактерија. Из сваке позитивне BBL™ MGIT™ културе мора се направити микроскопски препарат и обојити по Ziehl-Neelsenу. За бојење ових препарата не треба користити бојење флуорохромима. Поред тога, мора се извршити пресејавање на крвну плочу да би се проверила могућност контаминације. Тек на основу резултата прегледа препарата и налаза на крвном агару након инкубације од 16 до 24 сата, доноси се одлука о даљим поступцима (Табела 7.1). Позитиван резултат извештава се само у случају позитивне BBL™ MGIT™ културе и позитивног налаза ацидоалкохолорезистентних бацила на препарату направљеном из те културе. Исте препоруке требало би применити у случају позитивне културе детектоване применом аутоматизованог система MB/BacT Mycobacteria Detection System или BacT/ALERT Microbial Detection System. Препорука је да се негативан резултат култивисања на течним подлогама са осетљивом детекцијом пораста издаје након 42 дана инкубирања.

Табела 7.1. Смернице за поступање са позитивном BBL™ MGIT™ културом

Налаз на крвном агару	Налаз на микроскопском препарату	Резултат ^а /Поступак	DST
раст Ø	АРБ +	+ /идентификација	да
раст Ø	АРБ Ø	Ø /даља инкубација	не
раст +	АРБ Ø	контаминација/одбацити	не
раст +	АРБ +	брзорастуће/идентификација	не
раст +	АРБ +; друге +	+ и контаминација /деконтаминација	не

^а + Изолована култура ацидоалкохолорезистентних бацила; Ø Нису изоловани ацидоалкохолорезистентни бацили; АРБ – ацидоалкохолорезистентни бацили; DST - тест испитивања осетљивости на антитуберкулотике (Drug Susceptibility Testing).

За обе подлоге, BBL™ MGIT™ и BacT/ALERT® MP, јасно је доказано да пружају оптималне услове за изоловање микобактерија и да се њиховом применом знатно скраћује трајање микобактериолошке дијагностике. Оно што свакако треба нагласити јесте да је стандард у изоловању микобактерија засејавање клиничког узорка најмање на једну течну подлогу са осетљивом детекцијом пораста у комбинацији са још једном чврстом подлогом, најчешће LJ. Услед високе цене и ограничене доступности течних подлога, лабораторије наше мреже за дијагностику ТБ које користе ове подлоге, морају да праве селекцију клиничких узорака за засејавање. Основна препорука је да се засеје по један узорак сваког пацијента. Ако усвајање овакве препоруке није могуће, треба применити следеће критеријуме за избор узорака које треба засејати и на течне хранљиве подлоге са осетљивом детекцијом пораста:

1. по један узорак свих пацијената који су микроскопски позитивни;
2. узорке за лабораторијску дијагностику ванплућне ТБ;
3. узорке пацијената код којих постоји сумња на ТБ резистентну на лекове.

Још једном треба истаћи да селекција клиничких узорака за засејавање на течне хранљиве подлоге са осетљивом детекцијом пораста није у складу са правилима струке, већ је само нужна последица недостатка средстава за набавку ових подлога.

7.3. Брза идентификација изолованих култура микобактерија

Конвенционална идентификација изолованих култура микобактерија изводи се на основу микроскопских, културелних и физиолошко-биохемијских особина. Овакав поступак идентификације, као и сви остали сегменти конвенционалне микобактериолошке дијагностике, траје дуго и данас се више не сматра поузданим, нарочито за идентификацију НТМ.

7.3.1. Брза идентификација изолованих култура микобактерија применом имунохроматографских есеја

Имунохроматографски есеји омогућавају идентификацију изолованих култура микобактерија на нивоу *M. tuberculosis* комплекса, односно брзу диференцијацију између бацила ТБ и НТМ. Принцип ових тестова је детекција протеина МРВ64, који је специфичан антиген бактерија *M. tuberculosis* комплекса. Детекција се заснива на примени моноклонских антитела на МРВ64. Формат имунохроматографског есеја који се користи у мрежи лабораторија за дијагностику ТБ у Србији је BD MGIT™ TBc Identification Test (Becton, Dickinson and Company) (Слика 7.2.).

Слика 7.2. Имунохроматографски тест BD MGIT™ TBc за идентификацију *M. tuberculosis* комплекса



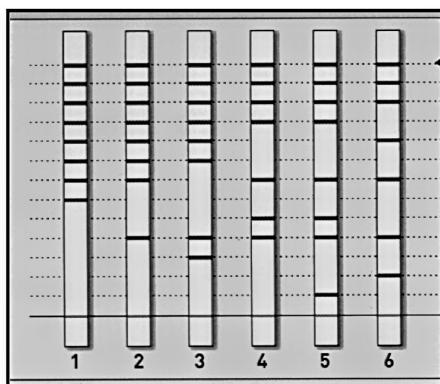
Тестови се изводе веома једноставно и не захтевају посебну лабораторијску опрему. Моноклонска антитела обележена колоидним партикулама са антигеном МРВ64 формирају антиген-антитело комплекс који се креће по површини тест траке, а „хвата“ га секундарно фиксирано антитело. На месту фиксације се за неколико секунди до минута појављује јасно уочљива обојена реакција. Ако се појаве обојене траке и у тест и у контролној зони, испитивана култура се идентификује као *M. tuberculosis* комплекс. Појава обојене траке само у контролној зони указује да испитивана култура није бацил ТБ. Тест се може користити за идентификацију култура микобактерија изолованих на чврстим и течним подлогама. Осетљивост BD MGIT™ TBc за идентификацију *M. tuberculosis* комплекса је 92,4% – 99,2%, а специфичност 100%.

7.3.2. Брза идентификација изолованих култура микобактерија применом молекуларних техника

Молекуларне технике омогућавају брзу, високо специфичну и осетљиву идентификацију култура микобактерија до нивоа врсте. Данас постоји више оваквих комерцијално доступних тестова, који се заснивају на различитим принципима. У мрежи лабораторија за дијагностику ТБ у Србији користе се GenoType® Mycobacterium MTBC и CM/AS (Hain Lifescience) есеји. GenoType® MTBC омогућава идентификацију 7 врста односно подврста у оквиру *M. tuberculosis* комплекса, а GenoType® CM/AS идентификацију култура *M. tuberculosis* комплекса и још 29 врста/комплекса НТМ. У питању су тестови препоручени за ову намену од стране СЗО и ECDC.

Принцип ових тестова је у основи исти као претходно описани принцип теста GenoType® MTBDRplus. Заснивају се на принципу реверзне хибридизације PCR продуката обележених биотином, а циљна секвенца за амплификацију је специес специфична секвенца у оквиру 23S рДНК. Многобројна испитивања показала су да је осетљивост GenoType тестова за идентификацију изолованих култура микобактерија 100%, а специфичност 97% до 100%. Резултат идентификације доступан је у року од свега неколико сати. Интерпретација добијених резултата је једноставна (Слика 7.3. и Слика 7.4), што је веома значајан квалитет за примену ових тестова у рутинском раду.

Слика 7.3. Смернице за тумачење резултата GenoType® Mycobacterium MTBC теста



- 1- *M. tuberculosis*;
- 2 - *M. africanum*;
- 3 - *M. microti*;
- 4 - *M. bovis ssp. bovis*;
- 5 - *M. bovis BCG*;
- 6 - *M. bovis ssp. caprae*

tuberculosis у присуству антитуберкулотика, али у течним подлогама са осетљивим системима за детекцију пораста. Принцип генотипских тестова, без обзира на конкретну молекуларну технику, јесте детекција мутација које су одговорне за појаву резистенције на дати антитуберкулотик. Једини приступ који омогућава откривање свих мутација јесте ДНК секвенцирање, али таква анализа још увек није реалност у рутинској и масовној дијагностици, чак ни у високо развијеним земљама. Стога се овим тестовима детектују оне мутације за које је показано да су најзначајније за настанак резистенције на одређени антитуберкулотик и најчешће присутне у геному великог броја испитиваних *M. tuberculosis* сојева.

7.4.1. Испитивање осетљивости *M. tuberculosis* на антитуберкулотике применом ВАСТЕС™ МГИТ™ 960 система

За извођење теста резистенције применом ВАСТЕС™ МГИТ™ 960 система, користи се стандардна МГИТ подлога са већ описаним принципом детекције пораста бактерија. Испитивана култура *M. tuberculosis* засејава се у две МГИТ епрувете, од којих једна садржи познату концентрацију лека, а друга је контрола раста, односно не садржи лек. Ако је испитивани сој *M. tuberculosis* осетљив на дати антитуберкулотик, раст у епрувети са леком биће инхибиран. То практично значи да у тој епрувети неће доћи до трошења кисеоника из комплекса са флуорохромом, тако да неће доћи ни до емисије флуоресценције. У епрувети без лека долази до раста и размножавања *M. tuberculosis*, троши се кисеоник и долази до детектабилне флуоресценције. ВАСТЕС™ МГИТ™ 960 инструмент региструје пораст нивоа флуоресценције, који се мери у такозваним јединицима раста или скраћено GU (Growth Units), а затим резултате аутоматски интерпретира.

Велики број студија показао је да је ВАСТЕС™ МГИТ™ 960 систем поуздан за утврђивање осетљивости *M. tuberculosis* на антитуберкулотике прве и друге линије. Просечно време трајања теста резистенције *M. tuberculosis* применом овог система је око 8 до 10 дана. Резултати се изражавају за сваки од антитуберкулотика појединачно у квалитативним категоријама S (осетљив) или R (резистентан). Детаљно упутство које је неопходно за практичну примену ВАСТЕС™ МГИТ™ 960 система за испи-

тивање осетљивости *M. tuberculosis* на антитуберкулотике доступно је у MGIT™ Procedure Manual (Siddiqi, S.H., Rüsч-Gerdes, S.). Национална референтна лабораторија, део у Клиничком центру Србије, располаже ВАСТЕС™ MGIT™ 960 системом и стога има кључну опрему за извођење испитивања осетљивости бацила ТБ на антитуберкулотике у течним подлогама. Услед проблема у вези са набавком подлога са лековима ово испитивање се још увек не користи у рутинској дијагностици.

7.4.2. Детекција резистенције *M. tuberculosis* на рифампицин и изониазид применом GenoType® MTBDRplus

Примена GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience) теста у микроскопски негативним и позитивним респираторним узорцима већ је описана. Поред тога, тест се може користити и у изолованим *M. tuberculosis* културама. GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience) је, као што је већ наведено, молекуларни тест који омогућава брзу потврду идентификације *M. tuberculosis* културе и детекцију резистенције на рифампицин и изониазид. Принцип примене теста у изолованим *M. tuberculosis* културама је идентичан претходно описаној примени у респираторним узорцима. Дефинисане су следеће кључне ситуације у којима лекари микробиолози, у сарадњи са лекарима клиничарима, треба да пошаљу културе на брзу молекуларну идентификацију бацила ТБ и испитивања осетљивости на рифампицин и изониазид:

1. једна култура од сваког пацијента за кога је доступан податак да је претходно лечен;
2. једна култура од сваког пацијента за кога је доступан податак да је из контакта са МДР ТБ;
3. једна култура од сваког пацијента код кога налаз у култури остаје позитиван и након три месеца лечења;
4. једна култура од сваког пацијента код кога постоји специфична медицинска (на пример, лекар процењује клинички ток као „лош“ и неадекватан одговор на примењено лечење; ХИВ серопозитивни пацијенти) и епидемиолошка индикација (на пример, боравак пацијента у земљи са високом преваленцијом МДР ТБ);

5. једна култура од сваког пацијента код кога је фенотипским тестом (метод пропорције) утврђена монорезистенција на рифампицин или изониазид;
6. најмање две културе од сваког пацијента код кога је фенотипским тестом (метод пропорције) утврђена мултирезистенција (резистенција на рифампицин и изониазид).

За све ситуације наведене под бројевима од 1. до 5. важи следећа препорука: ако се молекуларним тестом утврди да је изолат мултирезистентан, обавезно је слање још најмање једне културе на испитивање применом GenoType® MTBDRplus теста.

8. КОНТРОЛА КВАЛИТЕТА

Коришћење стандардизованих микробиолошких техника, у- постављање система управљана квалитетом и добра организација лабора- торијске мреже обезбеђују квалитетну микобактериолошку дијагностику. Под квалитетом се подразумева тачност и поузданост резултата анализа који су издати у очекиваном временском року. Примена концепта квали- тета подразумева успостављање система управљања квалитетом, што до- приноси смањењу настанка грешака и унапређењу услуга пацијентима.

Три главне компоненте програма за обезбеђење квалитета микобак- териолошке дијагностике су:

- **унутрашња контрола квалитета:** обухвата све начине на које лабора- торија контролише своју дијагностику, укључујући контролу апа- рата, боја, реагенаса, подлога и дијагностичких процедура.
- **спољашња контрола квалитета:** процес који омогућава поређење лабораторија у мрежи на основу тестирања контролних панела. Спољашња контрола може се спроводити и директно у току надзора рада лабораторија.
- **побољшање квалитета:** процес анализирања процедура и резултата дијагностике, сагледавање проблема и предузимање одговарајућих корективних мера. Унутрашња контрола квалитета обезбеђује кон- тинуирано праћење тачности и поузданости дијагностике, помаже да се проблем уочи. Предузимање корективних мера спречава по- нављање проблема. Побољшању квалитета доприносе и периодичне супервизијске посете у мрежи лабораторија.

8.1. Унутрашња контрола квалитета

Унутрашња контрола квалитета је обавезна за све запослене у лабора- торији. То је процес сталног праћења рада лабораторије по правилима постојећих протокола. Постојање унутрашње контроле квалитета обез-

беђује поуздане и репродуцибилне резултате директне микроскопије, изолације и идентификације микобактерија и теста за испитивање осетљивости *M. tuberculosis* на антитуберкулотике.

Унутрашња контрола квалитета се односи на све процедуре у дијагностици, као и на реагенсе и опрему који се користе у те сврхе. Контролом морају бити обухваћени:

1. организација лабораторије
2. особље лабораторије
3. опрема
4. узимање и транспорт узорака
5. лабораторијске процедуре
6. реагенси и подлоге
7. издавање резултата.

Организација лабораторије за дијагностику ТБ је дата у приручнику „Безбедност у раду у лабораторијама за дијагностику туберкулозе“. Контрола квалитета узимања и транспорта узорака, реагенаса, подлога, процедура и издавања резултата описана је у одговарајућим поглављима овог водича. Укратко ће бити описана едукација особља и одржавање опреме.

8.1.1. Особље лабораторије

Микобактериолошку дијагностику треба да раде добро обучени лекари специјалисти микробиологије и лабораторијски техничари. Планирати континуирану едукацију запослених у циљу подизања нивоа знања. Посебно обратити пажњу на едукацију особља у моменту започињања рада у микобактериолошкој лабораторији.

8.1.2. Лабораторијска опрема

- Уз сваки апарат мора постојати писано упутство за његову примену и чишћење.
- Датуми сервисирања морају бити регистровани.
- Неопходно је редовно одржавање апарата (дневно, месечно, годишње):

- дневно одржавање микроскопа - чишћење објектива и кондензора од имерзионог уља помоћу папира за брисање сочива алкохолом или смешом алкохола и етра (не користити ксилол јер оштећује оптички систем), прекрити микроскоп по завршеном раду; обавезно очистити објектив после микроскопирања позитивних препарата;
- месечно одржавање - уклањање прашине ваздушном струјом (Пастерова пипета са гуменим балоном), чишћење микроскопског сточића, уклањање прашине са микроскопа брисањем влажним папирним убрбусом;
- годишње одржавање - обавља професионални сервисер.
- комора за безбедан рад (видети у приручнику „Безбедност у раду у лабораторијама за дијагностику туберкулозе“);
- центрифуга – код центрифуга са хлађењем свакодневно забележити температуру; провера четкица и лежишта сваких 6 месеци;
- термостат - забележити температуру сваког јутра и пред крај радног дана, проверити температуру на више места унутар термостата постављањем термометра у боцу са водом;
- коагулатор - свакодневно проверити температуру, очистити га после сваке употребе;
- рН метар - користити стандардне пуферске растворе рН 4 и рН 7 пре сваког теста;
- водено купатило - проверити температуру пре и у току употребе, чишћење једном месечно;
- фрижидер - проверити температуру свакодневно, чишћење једном месечно;
- замрзивач - проверити температуру свакодневно, чишћење једном у 6 месеци;

8.1.3. Издавање резултата

Издавање резултата директне микроскопије, култивисања и теста резистенције је детаљно описано у одговарајућим поглављима. Анализа резултата у време издавања као и периодична анализа (на месечном, квар-

талном или полугодишњем нивоу) неопходна је како би се уочили евентуално присутни проблеми у дијагностици ТБ, предузеле корективне мере и тиме уклониле грешке при раду.

8.1.3.1. Дневна анализа резултата

Редовно анализирати следеће налазе:

Микроскопски позитиван/култура негативан узорак

Ако је узорак узет за контролу лечења, култура је негативна јер мртве бактерије не расту на подлогама, а могу се бојити као АРБ.

Ако је узорак узет у циљу дијагностике ТБ, разлог за овакав налаз може бити:

- већа концентрација раствора за обраду узорака или дуже време обраде;
- виша температура у току инкубације засејаних подлога;
- неодговарајућа фертилноост подлога.

Контаминирана подлога/узорак

Анализирати време од узимања узорка до обраде, ако је дуже од 72 сата, скратити транспорт односно узорак треба одмах обрадити.

Понављана контаминација: може се уочити током неких радних дана. Тада треба проверити стерилност раствора за обраду узорака, процес обраде, начин узимања и транспорта узорака.

Ако се понавља контаминација култура од истог пацијента, препоручује се „јача“ обрада само за узорке тог пацијента (двоструко већа количина раствора за обраду, а исто време обраде).

Груписање позитивних култура у серији: настаје због унакрсне контаминације негативног узорка и разлог је за појаву лажно позитивних налаза. У том случају анализирати следеће:

- да ли пацијент са позитивном културом има знаке ТБ;
- да ли тај пацијент има још неки узорак који је култура позитиван;
- појава култура са малим бројем колонија, које следе после култура са великим бројем колонија може бити знак унакрсне контаминације у току обраде узорака.

8.1.3.2. Периодична анализа резултата

У зависности од обима дијагностике, месечно, квартално или полугодишње треба анализирати резултате анализа узорака за дијагностику плућне ТБ (не узорака за праћење лечења) одраслих пацијената. Квартално или полугодишње анализирати и проценат контаминације подлога.

Узорци одраслих пацијената за дијагностику плућне ТБ се класификују у следеће групе:

- a* микроскопски позитивни и култура позитивни
- b* микроскопски позитивни и култура није рађена
- c* микроскопски негативни и култура позитивни
- d* микроскопски позитивни и култура негативни
- e* микроскопски позитивни и култура контаминирана
- f* микроскопија није рађена и култура позитивни.

За тако класификоване узорке израчунавају се следећи индикатори:

- Допринос културе дијагностици ТБ у испитиваној популацији

$$\frac{c + f}{a + b + c + d + e + f} \times 100$$

- Допринос културе дијагностици ТБ у односу на микроскопију:

$$\frac{c}{a + c + d + e} \times 100$$

Култивисање је осетљивије од директне микроскопије и очекује се да култура доприноси бар 20% бактериолошкој дијагностици плућне ТБ одраслих у односу на директну микроскопију.

- Процент микроскопија позитивних, а култура негативних узорака узетих за дијагностику.

$$\frac{d}{a + c + d + e} \times 100$$

Прихватљива вредност је 2-3%. Већи проценат од дозвољеног указује на „јаку“ обраду или дуг транспорт узорака.

8.1.3.2.1. Одређивање процента контаминације подлога

Процент контаминације подлога као индикатор користи се за процену квалитета обраде. Израчунава се као проценат контаминираних подлога (не узорака) у односу на укупан број инокулисаних подлога. За чврсте хранљиве подлоге износи 2–5%, а за течне 5-10%.

У Табели 8.1. дате су очекиване вредности за индикаторе за процену квалитета култивисања, као и разлози ако су вредности поменутих индикатора више или ниже.

Табела 8.1. Вредности индикатора за процену квалитета култивисања

Индикатор	Нормалне вредности (%)	Веће вредности	Ниже вредности
Допринос културе бактериолошкој дијагностици ТБ	20	А	Б и В
Процент микроскопски позитивних / култура негативних узорака	2–5	В и Г	Није проблем
Процент контаминације	ЛЈ: 2–5 течне подлоге: 5–10	Д	Ђ
А	<ul style="list-style-type: none"> Грешке у микроскопији: лажно негативни налази. Већи број пацијената откривених у почетној фази болести, што не представља проблем у лабораторијској дијагностици ТБ. 		
Б	<ul style="list-style-type: none"> Неселективност при узимању узорака, засејава се велики број узорака пацијената код којих не постоји оправдана сумња на ТБ. 		
В	<ul style="list-style-type: none"> Дуго време између узимања и обраде узорака. „Јака“ обрада узорака (велика концентрација раствора за обраду и / или дуго време обраде). Мала брзина центрифугирања. Ниска фертилност подлога. Инкубација подлога на вишим температурама. Узорак је узет у току праћења терапије, а означен да је за дијагностику. 		
Г	<ul style="list-style-type: none"> Грешка у микроскопији: лажно позитивни налази. 		
Д	<ul style="list-style-type: none"> Узорци се не чувају у фрижидеру. Дуго време између узимања и обраде узорака. „Слаба“ обрада: ниска концентрација раствора и /или кратко време обраде. Неисправна стерилизација. 		
Ђ	<ul style="list-style-type: none"> „Јака“ обрада узорака (велика концентрација раствора за обраду и / или дуго време обраде). Недовољна неутрализација узорака. Висока концентрација малахит зеленог у подлози. Инкубација подлога на вишим температурама. 		

8.2. Спољашња контрола квалитета

Спољашња контрола квалитета је ретроспективно и објективно упо­ређивање резултата добијених у различитим лабораторијама у оквиру посебно организованог програма. Један од задатака националне рефе­рентне лабораторије је организација програма за спољашњу контролу квалитета у мрежи лабораторија за дијагностику ТБ. Методе за спољашњу контролу квалитета су:

1. испитивање оспособљености (proficiency testing)
2. ретестирање и
3. евалуација на лицу места.

Све лабораторије за дијагностику ТБ требало би да планирају укљу­чивање у програме за спољашњу контролу за све процедуре микобакте­риолошке дијагностике преко неке од агенција за контролу квалитета лабораторијске дијагностике (нпр. INSTAND/WHO колаборативни цен­тар за обезбеђење квалитета и стандардизацију у лабораторијској меди­цини, Немачка).

8.2.1. Спољашња контрола квалитета директне микроскопије узорака спутума

Обухватити све лабораторије које раде директну микроскопију. Ме­тоде контроле су:

- преглед панела припремљених препарата (proficiency testing)
- слепо ретестирање
- евалуација на лицу места у оквиру редовног надзора.

Слепо ретестирање представља једини поуздан доказ квалитета ди­ректне микроскопије узорака спутума у мрежи лабораторија за дијагно­стику ТБ. Извештај контроле треба да садржи проценат лажно позитив­них, проценат лажно негативних налаза и предлог мера за корекцију ми­кроскопије.

8.2.2. Спољашња контрола квалитета теста за испитивање осетљивости на антитуберкулотике првог реда

Ова контрола обухвата:

- евалуацију на лицу места у оквиру редовног надзора;
- ретестирање свих изолата бацила ТБ који су резистентни на рифампицин и изониазид у националној референтној лабораторији (НРЛ); препоручује се ретестирање и 10% осетљивих изолата бацила ТБ;
- испитивање оспособљености (proficiency testing): анализа панела контролних кодираних сојева – супранационална референтна лабораторија (СРЛ) једном годишње шаље 20 сојева у НРЛ; НРЛ шаље контролне сојеве свим лабораторијама III нивоа у земљи.

Извештај резултата анализе контролних сојева треба да садржи:

- осетљивост теста - способност да открива стварно резистентне сојеве; $\text{осетљивост} = \frac{\text{број стварно резистентних}}{(\text{број стварно резистентних} + \text{број лажно осетљивих})}$;
- специфичност теста - способност да детектује стварно осетљиве сојеве; $\text{специфичност} = \frac{\text{број стварно осетљивих}}{(\text{број стварно осетљивих} + \text{број лажно резистентних})}$;
- ефикасност теста - број тачних у односу на укупан број резултата; $\text{ефикасност} = \frac{(\text{број стварно резистентних} + \text{број стварно осетљивих})}{\text{укупан број тестираних сојева}}$;
- предиктивну вредност за резистенцију - однос стварно резистентних према укупном броју резистентних;
- предиктивну вредност за осетљивост - однос стварно осетљивих према укупном броју осетљивих.

Критеријум за позитивну оцену лабораторија системом спољашње контроле квалитета је тачна детекција резистенције на изониазид и рифампицин у преко 90% контролних сојева у 2 од последња 3 циклуса контроле.

8.3. Побољшање квалитета

Унутрашња контрола квалитета је континуирана активност свих запослених. Стална контрола процеса рада и анализа резултата омогућавају уочавање и решавање актуелних проблема, што доприноси побољшању квалитета рада. Понекад се проблем најбрже реши у току стручног надзора (супервизије) који се спроводи у директном контакту са запосленима у лабораторији у току супервизијске посете.

Стручни надзор треба да обухвати све сегменте лабораторијског рада:

- пријем болесничког материјала и упуте за лабораторију;
- снабдевеност реагенсима и потрошним лабораторијским материјалом;
- лабораторијску опрему;
- заштиту на раду и уклањање инфективног материјала;
- методологију рада;
- лабораторијски регистар;
- контролу квалитета микроскопије, култивације и теста резистенције.

У току супервизије користе се стандардизовани упитници за надзор лабораторија I, II или III нивоа. После надзора, лабораторији се шаље извештај са предлогом мера за корекцију.

9. ЧУВАЊЕ СОЈЕВА МИКОБАКТЕРИЈА

Ово поглавље садржи детаљна упутства за правилно чување сојева микобактерија. Препоручује се чување свих изолованих култура *Mycobacterium tuberculosis* за случај да се укаже потреба за понављањем или извођењем додатних микробиолошких тестова. Изолати нетуберкулозних микобактерија (НТМ) и референтни сојеви микобактерија чувају се ради унутрашње контроле поступака микобактериолошке дијагностике. Сојеви микобактерија се чувају под тачно одређеним условима, како би се одржале њихова вијабилност и специфичне карактеристике.

9.1. Краткотрајно чување изолата микобактерија

Културе изолата *M. tuberculosis* могу се сачувати до једне године на чврстим хранљивим ЛЈ подлогама на $+4^{\circ}\text{C}$, тј. у фрижидеру. Ове културе се за кратко време, до неколико месеци, могу чувати на собној температури у мраку, јер временом долази до дезинтеграције чврсте хранљиве подлоге. Културе у течним хранљивим подлогама могу се чувати на температури фрижидера највише један месец. Квалитет течних хранљивих подлога се врло брзо мења, што утиче на вијабилност микобактерија. Такође, течне хранљиве подлоге се врло лако контаминирају.

9.2. Дуготрајно чување изолата микобактерија замрзавањем

Замрзавање омогућава чување сојева микобактерија током дужег временског периода, односно 5 година на -20°C или деценијама на -70°C . Вијабилност бацила ТБ током времена опада знатно брже када се чувају на -20°C , него на -70°C . Процењује се да после две године на -20°C преживљава само око 1% бактеријских ћелија, док је на -70°C преживљавање 100%. Из тог разлога, треба припремити суспензију микобактерија што веће густине. За разлику од бацила туберкулозе (ТБ), највећи број врста НТМ подједнако добро преживљава на обе температуре.

9.3. Поступак припреме и замрзавања суспензија микобактерија

Припрема сојева микобактерија за замрзавање се увек мора изводити у комори за безбедан рад уз придржавање принципа асептичке технике рада и употребу одговарајуће личне заштитне опреме.

9.3.1. Избор култура микобактерија за замрзавање

За замрзавање се користе субкултуре изолата *M. tuberculosis* на LJ подлози, без обзира да ли је примокултура изолована на чврстој или течној подлози. Користе се чисте културе старости од 10-15 дана, које показују добар и конфлуентан раст. Старије културе нису поуздане за дуготрајно преживљавање бацила током замрзавања.

9.3.2. Евиденција о замрзнутим културама микобактерија

О замрзнутим изолатима микобактерија се мора водити уредна евиденција у виду посебног документа који треба да садржи податке о изолату (број културе у лабораторијском протоколу, датум изоловања културе, датум замрзавања), податке о позицији изолата у замрзивачу (број полице у замрзивачу, број кутије и позиција у кутији) и евентуално податке о замрзивачу и просторији у којој се налази, ако лабораторија има више замрзивача (Прилог 1).

9.3.3. Подлоге за замрзавање култура микобактерија

За прављење суспензије микобактерија за замрзавање најчешће се користи течна хранљива подлога Middlebrook 7H9 са глицеролом или 5% глицерол са 0,85% NaCl. Направљена подлога се разлива у епрувете за замрзавање са поклопцем на навој, које се затим стављају у одговарајуће кутије од чврстог картона или пластике. Ако се користе епрувете запремине 2 мл, количина подлоге је 1,5 мл, а у мање епрувете од 1 мл, разлива се по 500 μ л подлоге.

9.3.4. Припрема раствора 5% глицерола и 0,85% NaCl за замрзавање култура микобактерија (пример за 10 сојева)

- 1) За сваки сој потребно је припремити по 2 тубице за замрзавање (укупно 20 тубица).
- 2) На зид тубице за замрзавање залепити налепницу и тубицу обележити бројем културе у лабораторијском протоколу и датумом замрзавања; други могући начин јесте да се на налепницу унесу подаци о позицији замрзнутог соја у кутији у замрзивачу, на пример број кутије/редно место у кутији (пр. 5/10, 5/11,...).
- 3) У посуди (нпр. ерленмајер) припремити укупно 10 мл раствора за замрзавање (20×500 μ л) на следећи начин:
 - 0,5 мл глицерола
 - 0,085 гр NaCl
 - 9,4 мл дестиловане воде.
- 4) Аутоклавирати припремљени раствор на 121°C током 15 мин.

9.3.5. Припрема суспензије микобактерија

Суспензија микобактерија треба да буде што веће густине, јер се број живих микобактерија током времена у замрзнутој суспензији смањује. Густина суспензије треба да износи >1,0 McFarland стандарда. Уколико лабораторија нема могућност мерења густине суспензије, треба узети што већи број колонија са LJ, водећи рачуна да се не узму и делови хранљиве подлоге. Суспензија се припрема на следећи начин:

- 1) сипати по 500 μ л претходно припремљеног раствора 5% глицерола и 0,85% NaCl у сваку тубицу;
- 2) стерилном езом, стерилним штапићем или стерилним памучним брисем навлаженим у стерилном физиолошком раствору или бујону узети што више колонија микобактерија и пребацити у тубицу са раствором;
- 3) кратко вортексирати;
- 4) поставити тубице у кутију за замрзавање;

5) уписати потребне податке о соју који се замрзава у одговарајућу табелу;

6) замрзнути суспензије на одговарајућој температури.

Суспензију направљену од клиничког изолатата треба чувати у две епрувете, по 1,5 мл. Када се једна епрувета одмрзне и искористи за култивисање клиничког изолатата, од нове културе се мора направити суспензија за замрзавање, тако да лабораторија увек располаже са две епрувете замрзнутог клиничког изолатата.

9.4. Дуготрајно чување референтних сојева (замрзавање)

Референтни сојеви морају бити увек доступни за извођење унутрашње контроле квалитета. Ови сојеви се не смеју одржавати серијским субкултивисањем, јер на тај начин могу настати генотипске (мутације) или фенотипске промене соја. Препорука је да се суспензија бактерија референтног соја замрзне у већем броју епрувета (на пример, 10 епрувета). О количини (броју епрувета) замрзнутих референтних сојева микобактерија се мора водити уредна евиденција у виду посебног документа (Прилог 2). **Референтни сојеви чувају се на -20°C или -70°C .**

9.4.1. Припрема суспензије референтних сојева микобактерија за замрзавање

Припрема суспензија референтних сојева изводи се на следећи начин:

- 1) субкултивисати референтни сој на неколико LJ подлога;
- 2) инкубирати на 37°C и пратити пораст;
- 3) након 10-15 дана инкубирања и појаве доброг, конфлуентног пораста, стерилном езом узети што више колонија без захватања подлоге;
- 4) размутити колоније у 15 мл бујона 7Н9 или у 15 мл раствора 5% глицерола и 0,85% NaCl са 6-10 стаклених куглица (пречник 2 мм) и вортексирати;
- 5) овако припремљену суспензију разлити у 10 тубица по 1,5 мл;

- 6) на налепницу на зиду тубице унети назив соја и датум припреме;
- 7) замрзнути на -20 или -70°C .

9.5. Транспорт замрзнутих сојева микобактерија

Када је потребно да се замрзнути сојеви микобактерија пошаљу у другу лабораторију, мора се водити рачуна да у лабораторији која је изоловала и замрзнула изолат увек остане најмање једна епрувета датог изолата. Сојеви који се транспортују треба да буду замрзнути најмање 48 сати пре транспорта. Поклопац епрувете за замрзавање треба облепити парафилмом, како би се спречило евентуално изливање садржаја у току транспорта. Паковање замрзнутих сојева микобактерија за транспорт је одговорност лабораторије која их шаље. Препоруке и правила за безбедан транспорт потенцијално инфективног материјала могу се наћи на интернет сајту (www.iata.org) Међународне асоцијације за ваздушни транспорт (*International Air Transport Association, IATA*).

9.6. Чување сојева микобактерија у мрежи лабораторија за дијагностику ТБ у Србији

Препорука је да лабораторије чувају све културе микобактерија изоловане на LJ подлози на собној температури, до добијања резултата идентификације и теста осетљивости на антитуберкулотике. Регионалне лабораторије за дијагностику ТБ требало би да чувају све примоизолате *M. tuberculosis* на температури -20°C или -70°C , у складу са могућностима. Сви резистентни изолати бацила ТБ (било који тип резистенције) требало би да се чувају на -70°C у НРЛ на Институту за микробиологију и имунологију Медицинског факултета Универзитета у Београду.

Прилог 1.

Замрзавање изолата <i>M. tuberculosis</i>					
Замрзивач број:			Просторија:		
Број културе у протоколу	Датум изоловања културе	Број кутије	Позиција у кутији	Датум замрзавања	Иницијали техничара

Прилог 2.

Референтни сој: <i>M. tuberculosis</i> H37Rv		
Суспензија у		Датум:
Број замрзнутих епрувета	Датум одмрзавања	Број преосталих епрувета
1		9
2		8
3		7
4		6
5		5
6		4
7		3
8		2
9		1
10		0 Замрзнути нову серију

10. БЕЗБЕДАН РАД У ЛАБОРАТОРИЈАМА ЗА БАКТЕРИОЛОШКУ ДИЈАГНОСТИКУ ТУБЕРКУЛОЗЕ

Особље у лабораторијама за бактериолошку дијагностику туберкулозе (ТБ) изложено је значајно високом ризику за настанак инфекције бактеријом *Mycobacterium tuberculosis*. Стопа инциденције ТБ међу особљем које је запослено у лабораторијама за дијагностику ТБ је 40 до 130 пута виша у односу на стопу инциденције ове болести у општој популацији. У поређењу са осталим категоријама здравствених радника, релативни ризик за обољевање од ТБ убедљиво је највиши за особље лабораторија за дијагностику ТБ. Најважнији пут настанка инфекције лабораторијског особља је инхалација инфективног аеросола. Инфективни аеросол је суспензија партикула микроскопске величине (1-60 μm) које носе живе бациле ТБ. Посебно висок ризик за лабораторијско особље представљају овакви нуклеуси чији је промер $\leq 5 \mu\text{m}$. Рутинска микобактериолошка дијагностика обухвата већи број процедура које су праћене настанком инфективног аеросола, али је ризик од настанка аеросола различит за различите процедуре. Остала два начина инфекције лабораторијског особља су директна инокулација и ингестија, али је њихов значај у поређењу са инхалацијом далеко мањи.

Превенција и сузбијање инфекције у лабораторијама за бактериолошку дијагностику ТБ захтевају управљачке (менаџерске) активности, административне мере контроле, мере контроле средине и употребу личне заштитне опреме.

10.1. Управљачке (менаџерске) активности

Кључна и прва активност је процена ризика на основу које треба направити план превенције и сузбијања инфекције у лабораторијама за бактериолошку дијагностику ТБ. Ризик представља комбинацију вероват-

ноће излагања некој опасности и последица догађаја везаних за ту опасност, а опасност се дефинише као било која могуће штетна ситуација (на пример, ломљење лабораторијског стакленог посуђа), активност (на пример, пипетирање инфективног материјала) или материјал (на пример, аеросол који садржи бациле ТБ). Кључни критеријуми који се узимају у обзир приликом процене ризика наведени су у даљем тексту.

10.1.1. Бациларност материјала са којима се ради

Приликом извођења директне микроскопије без обраде узорака као и поступака обраде узорака и засејавања хранљивих подлога, бациларност материјала којима се рукује је варијабилна и износи 0 – 10⁶ бацила/мл. Поступци са културама бацила ТБ, као што су прављење препарата из културе, извођење тестова идентификације и теста резистенције, увек подразумевају руковање материјалима високе бациларности, > 10⁸ бацила/мл.

10.1.2. Вијабилност бацила ТБ у материјалима са којима се ради

Вијабилност бацила ТБ у клиничким узорцима је непозната, али се претпоставља да је висока. Ту је свакако значајна разлика између узорака који су послати у лабораторију за дијагностику и узорака за праћење терапије. Вијабилност бацила након поступка обраде је значајно смањена, јер се процењује да се овим поступком убија и до 90% присутних бацила ТБ. Насупрот томе, вијабилност *M. tuberculosis* у културама је висока.

10.1.3. Профил резистенције бацила ТБ у материјалима са којима се ради

Кључни фактор који треба узети у обзир јесте учесталост мултирезистентних и екстензивно резистентних сојева бацила ТБ, која је значајно различита у различитим лабораторијама.

10.1.4. Вероватноћа настанка инфективног аеросола из датог материјала односно приликом извођења лабораторијских процедура

Вероватноћа настанка инфективног аеросола из вискозног узорка спутума се процењује као ниска, а највиша је приликом руковања суспен-

зијама бацила ТБ. Вероватноћа настанка инфективног аеросола током извођења директне микроскопије без обраде узорака је ниска, током обраде узорака и засејавања хранљивих подлога умерено висока, а приликом руковања културама бацила ТБ висока.

10.1.5. Број поступака праћених настанком аеросола током извођења дате процедуре

Јасно је да број оваквих поступака зависи од нивоа дијагностике ТБ коју дата лабораторија изводи. Најмањи је у лабораторијама I нивоа дијагностике ТБ, а највећи у лабораторијама III нивоа.

10.1.6. Број узорака/материјала са којима се ради у лабораторији

Начелно се процењује да је критична граница 5000 узорака годишње, односно да је у свим лабораторијама у којима се годишње анализира овај или већи број узорака ризик висок.

10.1.7. Обученост, вештина и искуство у раду особља лабораторије

Процењује се компетенција, спретност и искуство у руковању инфективним материјалом, примени асептичних техника и употреби коморе за безбедан рад. Такође се мора проценити и спремност за реакције у случају лабораторијских акцидената. Посебно важан сегмент јесте процена спремности и воље лабораторијског особља да прихвате одговорност како за сопствену заштиту, тако и за заштиту других.

10.1.8. Здравствено стање лабораторијског особља

Посебно треба узети у обзир болести/стања код којих је измењен имунски статус, што свакако подразумева повећану осетљивост на инфекцију бацилом ТБ.

10.1.9. Карактеристике простора, вентилација у лабораторији, стање опреме за безбедан рад (видети касније)

Процена ризика врши се за сваку појединачну лабораторију. Процену треба да изврше особе задужене за безбедност у раду у датој лабораторији, у сарадњи са управом здравствене установе којој лабораторија припада.

10.2. Административне мере контроле

Административне мере превенције и сузбијања инфекције бацилом ТБ у лабораторијама подразумевају дефинисање мера у складу са процењеним нивоом биолошке безбедности, који се захтева у датој лабораторији. У микробиолошким лабораторијама постоје четири нивоа биолошке безбедности. За сваки ниво дефинисани су захтеви који се односе на: конструкцију зграде у којој је смештена лабораторија; дизајн и организацију лабораторијског простора; могућност потпуног затварања дела лабораторије у којем се ради са инфективним материјалом; мере заштите средине; опрему за безбедан рад; правила понашања особља; и технике рада (Табела 1).

Табела 1. Основне карактеристике нивоа биолошке безбедности у микробиолошким лабораторијама

Карактеристике	Ниво 1	Ниво 2	Ниво 3	Ниво 4
Физички и функционално издвојен простор лабораторије	Не	Не	Да	Да
Могућност потпуног затварања дела лабораторије у којем се ради са инфективним материјалом	Не	Не	Не/Да*	Да
Природна или комбинована вентилација	Да	Да	Не	Не
Механичка вентилација	Не	Пожељно	Да	Да
Негативан притисак у делу лабораторије у којем се ради са инфективним материјалом	Не	Не	Не/Да*	Да
Улаз са двоструким вратима	Не	Не	Да	Да
Аутоклав у простору лабораторије	Не	Пожељно	Да	Да
Комора за безбедан рад	Не	Пожељно	Да	Да
Стално надгледање и комуникација	Не	Не	Да	Да

*Није обавезно према приручнику СЗО за безбедан рад у лабораторијама (Laboratory biosafety manual, WHO, 2004), али је захтев у неким националним приручницима и стандардима.

ВОДИЧ ЗА МИКРОБИОЛОШКУ ДИЈАГНОСТИКУ ТУБЕРКУЛОЗЕ

У лабораторијама за дијагностику ТБ процена захтеваног нивоа биолошке безбедности примарно зависи од процедура које се у лабораторији изводе (Табела 2).

Табела 2. Фактори за процену захтеваног нивоа биолошке безбедности у лабораторијама за дијагностику ТБ

Фактори који се мењају у зависности од процедуре или нивоа лабораторије за дијагностику ТБ	Процедура		
	Директна микроскопија без обраде узорака	Обрада узорака за микроскопију и културу; засејавање подлога	Руковање културама бацила ТБ; ДСТ
Релативни ризик (95% ИП) за обољевање од ТБ код особља у лабораторијама за дијагностику ТБ у поређењу са осталим здравственим радницима	1,4 (0,2 – 10)	7,8 (1,7 – 34,9)	22 (4,5 – 102,5)
Бациларност материјала којим се рукује	варијабилна 0 – 10 ⁶ бацила/ мл	варијабилна 0 – 10 ⁶ бацила/мл	увек висока > 10 ⁸ бацила/ мл
Вијабилност бацила ТБ	непозната, али се претпоставља да је висока	обрада убија до 90% бацила ТБ	висока
Вероватноћа настанка инфективног аеросола приликом извођења захтеваних процедура	ниска	умерено висока	висока
Захтевани ниво биолошке безбедности	други	трећи прихватљиво: други уз употребу коморе за безбедан рад	трећи

ИП, интервал поверења.

Административне мере превенције и сузбијања инфекције бацилом ТБ у лабораторијама подразумевају и следеће:

- дефинисање правила понашања у лабораторији у складу са захтевима безбедног рада
- програм обуке особља (уознавање са ризицима којима су изложени; савладавање техника безбедног извођења различитих процедура; употреба опреме за безбедан рад; употреба личне заштитне опреме; реакције у случају лабораторијских акцидентата)
- доступност приручника и упутстава за: безбедно извођење различитих процедура; употребу опреме за безбедан рад; употребу личне заштитне опреме; и одговарајуће реакције у случају лабораторијских акцидентата
- план за спровођење надзора примене препорука за безбедан рад током свих активности у лабораторији
- дефинисање карактеристика простора лабораторије у складу са захтевима безбедног рада
- дефинисање опреме неопходне за безбедан рад у лабораторији и план провере техничке исправности те опреме
- програм здравствене контроле особља лабораторије.

Руководилац лабораторије или особа одговорна за безбедност у раду у датој лабораторији дефинише административне мере превенције и сузбијања инфекције бацилом ТБ и надгледа њихово спровођење; за спровођење наведених административних мера одговорни су управа здравствене установе којој лабораторија припада и особље лабораторије.

10.3 Мере контроле средине

Кључне мере контроле средине у лабораторијама за дијагностику ТБ су простор одговарајућих карактеристика, вентилација, лампе са ултравиолетним (УВ) зрачењем и употреба коморе за безбедан рад.

10.3.1. Простор

У лабораторијама у којима је вероватноћа за настанак инфективног аеросола приликом извођења процедура ниска (микроскопски преглед клиничких узорака без претходне обраде), није потребно издвајање простора. Издваја се посебна радна површина за припрему препарата, која треба да буде у делу лабораторије одвојеном од дела за пријем узорака и дела за административни рад. Лабораторије у којима је вероватноћа за настанак инфективног аеросола приликом извођења процедура умерено висока (обрада клиничких узорака, изоловање бацила ТБ на вештачким хранљивим подлогама и руковање културама), требало би да буду у делу зграде одвојеном од осталог особља и пацијената дате установе. Лабораторије у којима је вероватноћа за настанак инфективног аеросола приликом извођења процедура висока (идентификација култура и тест испитивања осетљивости бацила ТБ), требало би да буду или у посебној згради или у делу зграде одвојеном од осталог особља и пацијената дате установе. Део лабораторије у којем се ради са инфективним материјалом мора бити одвојен од осталих делова лабораторије простором са двоја врата. Кључна радна површина у лабораторијама са умерено високим и високим ризиком од настанка аеросола је површина у комори за безбедан рад.

10.3.2. Вентилација

Вентилација треба да обезбеди једносмерни ток ваздуха у лабораторији од „чистог“ ка „прљавом“, у складу са процесом рада. Квалитет вентилације изражава се у броју размена целокупног собног ваздуха у једном сату. Одговарајући број измена ваздуха у лабораторијама за бактериолошку дијагностику ТБ је најмање 6 до 12 током једног сата. Примена природне вентилације препоручује се за лабораторије за дијагностику ТБ I нивоа, односно за лабораторије у којима је ризик од настанка аеросола низак. Препорука за лабораторије у којима је ризик од настанка аеросола умерено висок и висок је механичка вентилација. Ипак, у лабораторијама у којима се изводи дијагностика II нивоа може се применити комбинована вентилација. Комбинована вентилација представља употребу природне вентилације уз додатно коришћење једноставне механичке вентилације.

лације, као што је вентилатор у прозору. Захтев за лабораторије III нивоа дијагностике ТБ је механичка вентилација. У питању су механички вентилациони системи који континуирано уносе чист ваздух, усмеравају ток ваздуха од „чистог“ ка „прљавом“ делу лабораторије у складу са процесом рада и коначно избацују ваздух из лабораторије у спољашњу средину.

10.3.3. УВ лампе

Друга значајна мера контроле средине у лабораторијама за дијагностику ТБ II и III нивоа су УВ лампе. У питању су извори УВ зрачења са штитником који обезбеђују бактерицидно деловање УВ зрачења само у горњим деловима простора лабораторије. Овакве УВ лампе су безбедне за особље лабораторије, што значи да могу и треба да раде током целокупног радног времена. Носачи УВ лампи морају бити постављени тако да обезбеде равномерну дистрибуцију УВ зрака у горњим деловима просторије и да не излажу особље директном УВ зрачењу. Морају бити постављене тако да на висини од 1,7 м од пода измерено зрачење не сме бити веће од $0.1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Процењује се да је за простор површине 18 m^2 довољна одговарајуће постављена УВ лампа снаге 30W.

10.3.4. Комора за безбедан рад

Коморе за безбедан рад штите особље и окружење од излагања инфективним агенсима, а у зависности од класе и типа омогућавају и различите нивое заштите од контаминације материјала којим се рукује у комори. Приликом извођења обраде клиничких узорака, без обзира на примену принципа добрих микробиолошких техника, ризик за настанак инфективног аеросола је умерено висок. Руковање културама бацила ТБ, поступци за идентификацију и тест испитивања осетљивости, такође без обзира на примену принципа добрих микробиолошких техника, праћени су високим ризиком за настанак инфективног аеросола. Стога се сви наведени поступци морају изводити искључиво у комори за безбедан рад. За лабораторије за дијагностику ТБ препоручују се коморе за безбедан рад класа II тип А2. Особље лабораторије треба да свакодневно провера-

ва исправност коморе за безбедан рад. Ова свакодневна контрола обухвата визуелни преглед коморе, проверу путање ваздуха (миришљави штапић, папирна трака) и мерење брзине протока ваздуха анемометром. Техничку исправност коморе треба проверити приликом инсталације коморе и давања сертификата за рад; затим редовно једном годишње; и након померања коморе. Прегледе техничке исправности коморе треба да ради овлашћени технички сервис. Стандардна техничка провера исправности коморе подразумева одређивање профила брзине протока ваздуха на основу мерења овог параметра на више места у комори, одређивање броја честица у комори током рада и тестирање хомогености филтера. Замена филтера врши се по потреби, односно у складу са препорукама произвођача и на основу података добијених техничком провером исправности.

За спровођење мера контроле средине одговорни су управа здравствене установе којој лабораторија припада и особље лабораторије.

10.4. Лична заштитна опрема

Лична заштитна опрема у лабораторијама за дијагностику ТБ обухвата лабораторијске мантиле, рукавице, партикуларне маске (респираторе), заштитне наочаре, капе и навлаке за ципеле. Сумиране препоруке за употребу личне заштитне опреме у лабораторијама за дијагностику ТБ дате су у Табели 3.

Табела 3. Смернице за употребу личне заштитне опреме према нивоу ризика у лабораторијама за дијагностику ТБ

Опрема и одећа за личну заштиту	ТБ лабораторија (ниво ризика за настанак инфективног аеросола)		
	Низак ризик	Умерено висок ризик	Висок ризик
Партикуларна маска (респиратор)	НЕ	НЕ у рутинском раду ДА у случају акцидента	НЕ у рутинском раду/ по потреби према процењеном ризику ДА у случају акцидента
Хируршка маска	НЕ	НЕ	НЕ
Рукавице	ДА	ДА	ДА
Мантил	ДА	ДА	ДА
Мантил за једнократну употребу	НЕ	НЕ у рутинском раду ДА у случају акцидента	НЕ у рутинском раду ДА у случају акцидента

За исправну употребу личне заштитне опреме одговорни су управа здравствене установе којој лабораторија припада и особље лабораторије.

Детаљна упутства за безбедан рад у лабораторијама за дијагностику ТБ објављена су 2013. године у публикацији Министарства здравља Републике Србије, пројекта „Контрола туберкулозе у Србији“ и Медицинског факултета Универзитета у Београду, под називом „Безбедност у раду у лабораторијама за дијагностику туберкулозе“. Ова публикација укључује следеће стандардне оперативне процедуре (СОП):

- СОП 01/13 ТБ лаб: безбедно извођење директног микроскопског прегледа клиничких узорака у лабораторијама за дијагностику туберкулозе
- СОП 02/13 ТБ лаб: безбедно извођење обраде клиничких узорака и изоловања бацила туберкулозе на хранљивим подлогама
- СОП 03/13 ТБ лаб: безбедно извођење идентификације култура и теста испитивања осетљивости бацила туберкулозе

- СОП 04/13 ТБ лаб: употреба коморе за безбедан рад у лабораторијама за дијагностику туберкулозе
- СОП 05/13 ТБ лаб: употреба личне заштитне опреме у лабораторијама за дијагностику туберкулозе
- СОП 06/13 ТБ лаб: употреба дезинфицијенаса у лабораторијама за дијагностику туберкулозе
- СОП 07/13 ТБ лаб: поступак у случају лабораторијског акцидента у лабораторијама за дијагностику туберкулозе

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th ed. Washington, DC, 2007. United States Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 2007.
2. Centers for Disease Control. Acid-Fast Direct Smear Microscopy. A laboratory training program. USA, 2000.
3. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, et al. (2007) A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess* 11(3).
4. Drobniowski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V; the WHO European Laboratory Strengthening Task Force. Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe. *Eur Respir J*. 2006;28(5):903-909.
5. Drobniowski FA, Nikolayevskyy V, Hoffner S, et al. (2008) The added value of a European Union tuberculosis reference laboratory network – analysis of the national reference laboratory activities. *Eurosurveillance* 13: 1-7. (www.eurosurveillance.org)
6. External quality assessment for AFB smear microscopy. APHL, CDC, IUATLD, KNCV, RIT, WHO, 2002.
7. Fujiki A. TB bacteriology examination to stop TB. Research Institute of Tuberculosis Japan Anti-Tuberculosis Association, 2001.
8. Fujiki A. AFB microscopy training. Research Institute of Tuberculosis Japan, Anti-Tuberculosis Association, IUATLD, USAID, 2005
9. Fujiki A. TB microscopy for national tuberculosis program. Research Institute of Tuberculosis Japan, 2007.
10. Guidance for countries on the preparation and implementation of TB laboratory standard operating procedures (SOPs), 2009 (http://www.tbcare1.org/publications/toolbox/tools/complab/Lab_Tools.zip).
11. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. Geneva, World Health Organization, 2003 (WHO/CFS/TB2003/320; WHO/CDS/CSR/RMD/2003.3)
12. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva, World Health Organization, 2006 (document WHO/HTM/TB/2006.361).
13. Jacobs DS, Demott WR, Finley PR, Horvat RT, Kasten BL, Tilzer LL. *Laboratory Test Handbook*. 3rd ed. Hudson (Cleveland): Lexi-Comp inc, 1994. p.770-771.
14. Kantos F, Maniati M, Castopoulos C, et al. (2004) Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs: a multicenter study. *J Microbiol Methods* 56:292–294.
15. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott;1997.p. 893-952.
16. *Laboratory biosafety manual*, 3rd ed. Geneva, World Health Organization, 2004.
17. *Laboratory services in tuberculosis control*. Parts I, II and III. Geneva. World Health Organization, 1998 (WHO/TB/98.258)
18. Laszlo A et al. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory

- Network: first round of proficiency testing. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 1997, 1:231-238.
19. Lumb R, Bastian I. Laboratory diagnosis of TB by sputum microscopy. Institute of Medical and Veterinary Science, South Australia 2005.
 20. *Mastering the basics of TB control*, Stockholm, ECDC, 2011.
 21. Methchock BG, Nolte FS, Wallace RJ. *Mycobacterium*. In: Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press; 1999.p.399-437.
 22. *Mycobacteriology Laboratory Manual*, 1st ed. Geneva, Stop TB Partnership, 2014. (http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli_mycobacteriology_lab_manual_web.pdf)
 23. Palomino JC. (2009) Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1-9.
 24. *Priorities for tuberculosis bacteriology services in low-income countries*, second edition. Paris, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2007
 25. Richter E, Rüsç –Gerdes S, Hillemann D. (2006) Evaluation of the GenoType *Mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J Clin Microbiol* 44: 1769–1775.
 26. Rüsç –Gerdes S, Pfyffer GE, Casal M, et al. (2006) Multicenter Laboratory Validation of the BACTEC MGIT 960 Technique for Testing Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to Classical Second-Line Drugs and Newer Antimicrobials. *J Clin Microbiol* 44: 688-692.
 27. Savić B, Vuković D, Stefanović G, Vukelić A, Tomić Lj, Kurucin T, Mirović V, Pavlica R, Dakić I, Dugalić Sredojević G. *Vodič za mikrobiološku dijagnostiku tuberkuloze*. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Beograd, 2007.
 28. Savić B, Vuković D, Stefanović G, Tomić Lj, Dakić I. *Vodič za mikrobiološku dijagnostiku tuberkuloze (II izdanje)*. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Beograd, 2009.
 29. Schwoebel V, Lambregts-van Weezenbeek CS, Moro ML, Drobniewski F, Hoffner SE, Raviglione MC, Rieder HL. Standardization of antituberculosis drug resistance surveillance in Europe. Recommendations of a World Health Organization (WHO) and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) Working Group. *Eur Respir J*. 2000;16(2):364-371.
 30. Shamputa IC, Rigouts L, Portaels F. (2004) Molecular genetic methods for diagnosis and antibiotic resistance detection of mycobacteria from clinical specimens. *APMIS* 112: 728–752.
 31. Siddiqi SH, Rüsç-Gerdes S. (2006) *MGIT™ Procedure Manual*. Foundation for Innovative New Diagnostics.
 32. *The public health service national tuberculosis reference laboratory and the national laboratory network: minimum requirements, roles and operation in low-income countries*. Paris, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1998.
 33. *Tuberculosis laboratory biosafety manual*, Geneva, World Health Organization, 2012.
 34. Vuković D, Dakić I, Savić B. *Bezbednost u radu u laboratorijama za dijagnostiku tuberkuloze*. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Beograd, 2013.
 35. World Health Organization (WHO). (2008) Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Policy Statement. Available at http://www.who.int/entity/tb/dots/laboratory/lpa_policy.pdf

12. ПРИЛОГ – ОБРАСЦИ

TB LAB-1a

Упут за испитивање на микобактерије са извештајем о микроскопском прегледу

TB LAB-1b

Упут за испитивање на микобактерије са извештајем о култивисању

TB LAB-1c

Упут за испитивање на микобактерије са извештајем испитивања осетљивости на антитуберкулотике

Лабораторијски регистар за туберкулозу за микроскопске лабораторије

Лабораторијски регистар за туберкулозу за лабораторије II и III нивоа

Евиденциона листа лабораторијских акцидената

Формулар за слање сојева

Образац за пријаву лабораторijskog акцидента

Ustanova:	
Naziv laboratorije:	
Rukovodilac laboratorije:	
Datum i vreme akcidenta:	
Tip akcidenta (šta se dogodilo?)	
<p>Obim akcidenta:</p> <ul style="list-style-type: none"> • zapremina prosutog materijala • polomljeno staklo (da ili ne) • opis/vrsta/tip kontaminiranih površina • spisak kontaminiranog materijala/opreme • spisak uzoraka koji su uključeni u akcident 	
Spisak osoba prisutnih u laboratoriji u trenutku akcidenta	
<p>Spisak osoba sa fizičkim povredama (ako se dogodilo)</p> <p>Priroda fizičkih povreda</p>	
Ime lekara odgovornog za pružanje prve pomoći	
Ime lekara odgovornog za zdravstveni nadzor laboratorijskog osoblja	
<p>Korektivne mere:</p> <ul style="list-style-type: none"> • kako sprečiti laboratorijski akcident; • kako doprineti da se osoblje bolje pridržava mera za bezbedan rad u laboratoriji 	

NACIONALNA REFERENTNA LABORATORIJA ZA TUBERKULOZU

Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, dr Subotića 1, 11000 Beograd, Srbija
Telefon: +381 11 3643 376, +381 11 3643 375, +381 11 3643 365, +381 3643 368; Fax: +381 11 3643 366
prof. dr Branislava Savić, e-mail: branislava.savic@mhub.bg.ac.rs; prof. dr Dragana Vuković, e-mail: draganavukovic@mhub.bg.ac.rs;
prof. dr Ivana Dakić, e-mail: ivanadakic@med.bg.ac.rs; asist. dr Irena Arandelović, e-mail: irena.zivanovic@mhub.bg.ac.rs

Formular za slanje sojeva

PODACI O LABORATORIJI KOJA ŠALJE KULTURU

Naziv laboratorije/ustanove: _____

Adresa i mesto: _____

Telefon/e-mail: _____ Kontakt osoba: _____

PODACI O BAKTERIJSKOM IZOLATU

Datum izolacije: _____ Datum slanja izolata: _____ Br. u protokolu laboratorije koja šalje: _____

Rezultat identifikacije: _____

Profil osetljivosti izolata na antituberkulotike prve linije:

Isoniazid osetljiv rezistentan

Rifampicin osetljiv rezistentan

Etambutol osetljiv rezistentan

Streptomycin osetljiv rezistentan

PODACI O KLINIČKOM MATERIJALU IZ KOGA JE SOJ IZOLOVAN

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> sputum | <input type="checkbox"/> urin |
| <input type="checkbox"/> bronhoalveolarni lavat (BAL) | <input type="checkbox"/> stolica |
| <input type="checkbox"/> bronhijalni aspirat | <input type="checkbox"/> krv |
| <input type="checkbox"/> gastrični lavat (ispirak želuca) | <input type="checkbox"/> gnoj |
| <input type="checkbox"/> bris _____ | <input type="checkbox"/> tkivo _____ |
| <input type="checkbox"/> likvor | <input type="checkbox"/> telesne tečnosti _____ |

PODACI O PACIJENTU

Ime i prezime: _____ Godina rođenja: _____

JMBG: _____ Pol: muški ženski

Istorija prethodnog lečenja: _____ Razlog ispitivanja: _____

novooboleli dijagnostika

prethodno lečen * praćenje lečenja

* Navesti gde je pacijent lečen: _____

Odgovorni lekar u trenutku kada je uzet uzorak: _____

NACIONALNA REFERENTNA LABORATORIJA ZA TUBERKULOZU

Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, dr Subotića 1, 11000 Beograd, Srbija
Telefon: +381 11 3643 376, +381 11 3643 375, +381 11 3643 365, +381 3643 368; Fax: +381 11 3643 366

ВОДИЧ ЗА МИКРОБИОЛОШКУ ДИЈАГНОСТИКУ ТУБЕРКУЛОЗЕ

„Водич за микробиолошку дијагностику туберкулозе“ је припремљен и штампан у оквиру реализације пројекта Министарства здравља Републике Србије **“Контрола туберкулозе у Србији”**, за који је финансијска средства обезбедио Глобални фонд за борбу против AIDSa, туберкулозе и маларије.

Министарство здравља Републике Србије, 2015. година

Аутори:

Проф. др Бранислава Савић,
Проф. др Драгана Вуковић,
Проф. др Ивана Дакић,
Асист. др Ирена Аранђеловић

Издавач:

Министарство здравља Републике Србије

Припрема и штампа:

New Assist

Тираж

300

Београд

2015.

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

616-002.5-078(035)

ВОДИЧ за микробиолошку дијагностику туберкулозе / [аутори Бранислава Савић... и др.]. - Београд : Министарство здравља Републике Србије, 2015 (Београд : New Assist). - 136 стр. : илустр. ; 24 cm

На врху насл. стр.: Пројекат "Контрола туберкулозе у Србији", Медицински факултет Универзитет[а] у Београду. - Подаци о ауторима преузети из колофона. - Према предговору, ово је 3. измењено и допуњено изд. [група аутора у претходном издању је делимично измењена]. - Тираж 300. - Библиографија: стр. 126-128.

ISBN 978-86-80152-02-8

1. Савић, Бранислава, 1957- [аутор]

а) Туберкулоза - Микробиолошка дијагностика - Приручници
COBISS.SR-ID 214034956

