	Naziv: SAKUPLJANJE I TRANSPORT UZORAKA FECESA ZA BAKTERIOLOŠKU DIJAGNOSTIKU TOKOM EPIDEMIJSKE POJAVE AKUTNOG DIJAREJALNOG SINDROMA			Oznaka: UP - 148
	Odobrio: Nacelnik Centra za mikrobiologiju	Izdanje: II	Važi od: 01.09.2008.	Strana: 1 od 6

1. UVOD

Uputstvo opisuje sakupljanje uzoraka fecesa i transport u Referentnu laboratoriju za *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* u toku epidemijske pojave akutnog dijarejalnog sindroma kod sumnje na salmoneloze, bacilarnu dizenteriju, jersiniozu i koleru.

Uzorke fecesa (ili rektalne briseve kod male dece) treba uzeti kod obolelih koji zadovoljavaju sva tri kriterijuma:

- vodena ili krvava dijareja,
- akutni stadijum bolesti, tj. bolest se manifestuje u periodu kraćem od 4 dana od trenutka uzorkovanja, kada su verovatni uzročnici obično prisutni u fecesu u najvećem broju (izuzetak su oboleli od trbušnog tifusa kod kojih se najveći broj *Salmonella Typhi* izlučuje fecesom tokom druge i treće nedelje bolesti),
- nije primenjivana antibiotska terapija od početka bolesti.

2. UZIMANJE UZORAKA

2.1 Materijal

- čista suva plastična posuda širokog otvora sa kašičicom -flakon, (bez dezinficijensa ili ostataka deterdženta) sa poklopcem koji se čvrsto zavrće
- nalepnica za obeležavanje flakona
- 2 sterilna brisa
- Cary Blair transportna podloga
- rukavice

2.2. Procedura uzimanja uzoraka

2.2.1. Uzorci fecesa

- Pacijenta uputiti na proceduru davanja uzorka: podići sedište toaleta i pokriti otvor toaleta velikim komadom novinske hartije ili plastične kese; rukom napraviti udubljenje za skupljanje fecesa; spustiti sedište toaleta i sedeti; defecirati na novinsku ili plastičnu foliju.
- Ne uzorkovati feces iz toaleta.
- Uzorke fecesa ne testirati ukoliko su pomešani sa urinom ili vodom iz toaleta.
- Na flakon nalepiti nalepnicu sa podacima o uzorku: identifikacioni broj, ime i prezime pacijenta, datum i vreme uzorkovanja.
- Svež uzorak fecesa (vodene, krvave, sluzave delove) uzeti kašičicom iz flakona (5ml za tečne ili 1g za formirane uzorke, kao zrno graška).
- Kašičicom iz flakona homogenizovati uzorak.
- Čvrsto zatvoriti flakon zavrtanjem poklopca.
- Popuniti uputnu listu sa traženim podacima o uzorku.

INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE SRBIJE DR MILAN JOVANOVIĆ BATUT	Izdanje: II	Važi od: 01.09.2008.	Strana: 2 od 6	Oznaka: UP - 148
--	-------------	----------------------	----------------	----------------------------

- Uzorke upakovati u vidu trostrukog ili dvostrukog pakovanja i transportovati u ručnom frižideru na 4-8 °C u laboratoriju u roku od 2h.
- Uzorci koji ne mogu biti transportovani i bakteriološki obrađeni u tom periodu odmah se stavljaju u transportnu Cary Blair podlogu.

2.2.2. Rektalni bris

Umesto uzoraka fecesa ponekad se uzima rektalni bris, uglavnom kod male dece.

- Na epruvetu sa Cary Blair podlogom nalepiti nalepnicu sa podacima o uzorku: identifikacioni broj, ime i prezime pacijenta, datum i vreme uzorkovanja.
- Navlažiti sterilan bris zaranjenjem u prethodno ohlađenu Cary Blair podlogu .
- Brisem ući u rektum prolazeći analne sfinktere (dubina 2-3 cm) i nežno ga zarotirati.
- Izvaditi bris iz rektuma i proveriti da li je ostalo fekalnih masa na njemu (ukoliko nije istim brisem ponoviti postupak).
- Bris uroniti u Cary Blair podlogu do dna.
- Odlomiti višak drvenog štapića brisa i baciti ga.
- Zatvoriti epruvetu zatvaračem sa navrtnjem.
- Popuniti uputnu listu sa traženim podacima o uzorku.
- Čuvati podlogu sa brisem u frižideru na 4-8 °C do transporta.

2.3. Transportne podloge

Cary Blair transportna podloga je optimalna podloga za prezervaciju većine crevnih patogenih bakterija. Polučvrsta konzistencija omogućava lak transport, a gotova podloga se može čuvati i na sobnoj temperaturi do 1 godine. Visok pH (8.4) održava vijabilnost *V. cholerae* (Dodatak 1).

Alkalna peptonska voda (APV) se koristi za transport samo uzoraka sumnjivih na *V. cholerae*, ali je lošija u odnosu na Cary Blair i treba je koristiti samo kada Cary Blair nije dostupan. APV ne treba koristiti kada nije moguća subkultivacija APV posle 6h inkubacije. APV inokulisati sa tečnim uzorkom ili rektalnim brisem. Količina inokuluma ne sme da bude veća od 10% u odnosu na volumen podloge.



Slika 1 Cary Blair podloga sa uzorkom

2.3.1. Upotreba Cary Blair podloge

- Cary Blair podlogu pre korišćenja staviti na 4-8 °C 1-2h da se ohladi
- Epruvetu sa podlogom obeležiti nalepnicom sa podacima o uzorku (laboratorijski identifikacioni broj, ime i prezime pacijenta, vrsta uzorka, datum i vreme uzorkovanja).
- Sterilan bris ovlažiti u prethodno ohlađenoj podlozi a zatim u uzorak fecesa, zarotirati i pokupiti malu količinu fecesa (ukoliko je pristan gnoj ili sluz obavezno ga uzorkovati istim brisem).
- Bris sa fecesom uroniti u Cary Blair podlogu do dna.
- Odlomiti višak štapića brisa i baciti ga.

INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE SRBIJE <i>DR MILAN JOVANOVIĆ BATUT</i>	Izdanje: II	Važi od: 01.09.2008.	Strana: 3 od 6	Oznaka: UP - 148
---	-------------	----------------------	----------------	----------------------------

- Zatvoriti epruvetu zatvaračem sa zavrtnjem.
- Popuniti uputnu listu sa traženim podacima o uzorku.
- Čuvati podlogu sa brisem u frižideru na 4-8 °C do transporta.
- Broj uzetih briseva zavisi od broja podloga koje treba inokulisati. Ukoliko će se uzorak ispitivati na više od jednog uzročnika treba uzeti dva brisa fecesa ili rektalna brisa od jednog pacijenta i oba staviti u istu transportnu podlogu.

2.3.2. Čuvanje uzoraka u Cary Blair podlozi

- Čuvanje uzoraka u Cary Blair podlozi je obavezno na 4-8 °C do transporta, maksimalno 48-72h.
- Ukoliko je potrebno vreme za transport i obradu duže od 48-72h, uzorak u transportnoj podlozi odmah zamrznuti na -70 °C.

3. TRANSPORT UZORAKA DO REFERENTNE LABORATORIJE

Obzirom da u Republici Srbiji ne postoji nacionalni vodič/uputstvo za transport infektivnih supstanci, do donošenja takvog uputstva referentna laboratorija preporučuje poštovanje uputstva o transportu infektivnih supstanci SZO (1). Prema njemu navedene vrste uzoraka, od 1.januara 2007., nazivaju se “ BIOLOŠKA SUPSTANCA, B KATEGORIJA” i transport tih uzoraka je obavezan u vidu “trostrukog pakovanja”.

Međutim, pošto se transport uzoraka u našoj zemlji najčešće obavlja drumskim saobraćajem preko kurira pošiljaoca, referentna laboratorija predlaže da u nemogućnosti korišćenja trostrukog pakovanja se primenjuje dvostruko pakovanje uzoraka pod uslovom da se transportuje u ručnom frižideru uz upotrebu pakovanja sa ledom.

Iako je upotreba transportne podloge preporuka referentne laboratorije, ukoliko je moguć transport na 4°C i bakteriološka obrada svežih uzoraka fecesa u roku od 2h od uzorkovanja, nije neophodno korišćenje transportne podloge.

Ako je za to potrebno vreme duže od 2h obavezna je upotreba Cary Blair podloge. Uzorci u transportnoj podlozi moraju stići u referentnu laboratoriju za 24h ako se transportuju na 25°C. Ukoliko se uzorci transportuju na 4°C maksimalno dozvoljeno vreme od uzorkovanja je 48-72h.

Ukoliko se transportuju uzorci zamrznuti na -70°C, obavezno je korišćenje suvog leda.

3.1. Trostruko pakovanje uzoraka

Primarno pakovanje

- Uzorak se nalazi u obeleženoj primarnoj posudi (plastična epruveta ili flakon sa zavrtnjem) čvrsto zatvorenoj (onemogućiti curenje ili kontaminaciju uzorka) i umotanoj u upijajući materijal (pamučna vata ili upijajuća hartija).

Sekundarno pakovanje

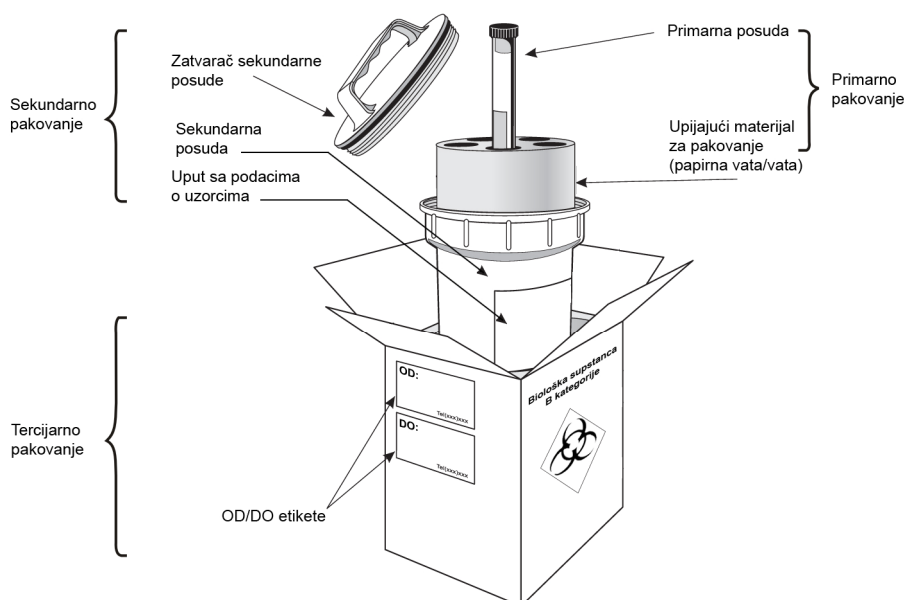
- Sekundarna posuda, plastična čvrsta nepropusna sa zavrtnjem, služi da se u nju pakuju primarne posude.
- Između primarnih posuda i sekundarne posude neophodno je staviti najlonsku oblogu (puckavac) koja će da odvoji sve primarne posude od sekundarne.
- Na sekundarnu posudu nalepiti uput o podacima o uzorcima zaštićen u plastičnu foliju.

INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE SRBIJE <i>DR MILAN JOVANOVIĆ BATUT</i>	Izdanje: II	Važi od: 01.09.2008.	Strana: 4 od 6	Oznaka: UP - 148
---	-------------	----------------------	----------------	----------------------------

- Podatke o uzorcima upisati u Uputnu listu o pacijentima za uzorke fecesa sakupljene za vreme epidemije akutnog dijarejalnog sindroma u dva primerka, jedan dostaviti uz uzorak laboratoriji, a drugi čuva pošiljalac (U prilogu).

Tercijerno pakovanje

- Tercijerna posuda služi za zaštitu sekundarnog pakovanja od fizičkog oštećenja, vode i kao spoljni omotač.
- Treba koristiti posude od čvrste plastike, metala ili čvrstog kartona.
- Tercijerna posuda mora biti obeležena nalepticama: oznaka biohazarda i "BIOLOŠKA SUPSTANCA, KATEGORIJA B"
- Na tercijernoj posudi napisati podatke o pošiljaocu i primaocu (ustanova, adresa, odgovorna osoba i telefon).
- Ukoliko se u pakovanje stavljaju paketi leda, kutije sa ledom se smeštaju oko sekundarne posude a tercijerna posuda mora biti nepropusna (metal, plastika).



Slika 2. Trostruko pakovanje uzoraka

3.2. Dvostruko pakovanje uzoraka

- Uzorci koji se transportuju u ručnom frižideru preko kurira pošiljaoca mogu se pakovati kao "dvostruka pakovanja".
- Primarna i sekundarna posuda su istovetne kao u trostrukom pakovanju.
- Sekundarna posuda mora biti obeležena nalepticama: OZNAKA BIOHAZARDA i "BIOLOŠKA SUPSTANCA, KATEGORIJA B"
- Na sekundarnu posudu nalepiti uput o podacima o uzorcima zaštićen u plastičnu foliju.
- Podatke o uzorcima upisati u Uputnu listu o pacijentima za uzorke fecesa sakupljene za vreme epidemije akutnog dijarejalnog sindroma u dva primerka, jedan dostaviti uz uzorak laboratoriji, a drugi čuva pošiljalac (U prilogu).
- Na sekundarnoj posudi napisati podatke o pošiljaocu i primaocu (ustanova, adresa, odgovorna osoba i telefon).
- U unutrašnjost ručnog frižidera staviti nepropusne kutije sa ledom.

INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE SRBIJE <i>DR MILAN JOVANOVIĆ BATUT</i>	Izdanje: II	Važi od: 01.09.2008.	Strana: 5 od 6	Oznaka: UP - 148
---	-------------	----------------------	----------------	----------------------------

4. LITERATURA

1. Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances. WHO/CDS/CSR/LYO/2005.22
2. Guidelines for the collection of clinical specimens during field investigation of outbreaks. WHO. Department of Communicable Disease Surveillance and Response. WHO/CDS/CSR/EDC/2000.4
3. Wells J. Bacterial Agents of Enteric Diseases of Public Health Concern in Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Agents of Public Health Importance in the Developing World. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.6
4. Isenberg HD. Fecal Culture for Aerobic Pathogens of Gastroenteritis in Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. 2004. ASM Press Washington, DC.

5. PRILOG:

1. Uputna lista o pacijentima za uzorke fecesa sakupljene za vreme epidemije akutnog dijarejalnog sindroma

INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE SRBIJE <i>DR MILAN JOVANOVIĆ BATUT</i>	Izdanje: II	Važi od: 01.09.2008.	Strana: 6 od 6	Oznaka: UP - 148
---	-------------	----------------------	----------------	----------------------------

Dodatak 1

Modifikovana Cary Blair transportna podloga

(sadrži 1.6g/l agara umesto 5g/l)

<i>natrijum tioglikolat</i>	1.5g
<i>dinatrijum fosfat</i> (<i>s. dinatrijumhidrogen fosfat</i>)	1.1g
<i>natrijum hlorid</i>	5.0g
<i>fenol crveno</i>	0.003g

Navedene supstance rastvoriti u 991 ml destilovane ili demineralizovane vode.

Dodati:

<i>Agar</i>	1.6g
-------------	------

Zagrejati podlogu dok ne postane prozirna, a zatim je rashladiti na 50°C i dodati

<i>Kalcijum hlorid 1% rastvor</i>	9.0ml
-----------------------------------	-------

pH podloge podesiti na 8.4; razliti u sterilne plastične epruvete u količini 7ml; sterilisati u autoklavu 15', ohladiti i zatvoriti epruvete zapašačima koji se zavrću.

Čuvati u zatvorenoj plastičnoj kesici na 4-8°C (može i na ambijentalnoj do 25°C). Rok trajanja 1 godina.

Obavezno pre upotrebe prekontrolisati kvalitet podloge kontrolnim mikroorganizmima *Shigella* spp. i *Campylobacter* spp. (kolekcija ATCC, NCTC, CCM ili domaće laboratorijske kolekcije).

Alkalna peptonska voda

<i>Pepton</i>	10.0g
<i>Natrijum hlorid</i>	10.0g
<i>Destilovana voda</i>	1000.0ml

pH podloge podesiti na 8.4-9.2; razliti u sterilne plastične epruvete u količini 8-10ml; sterilisati u autoklavu 15', ohladiti i zatvoriti epruvete zapašačima koji se zavrću. Čuvati u zatvorenoj plastičnoj kesici na 4-8°C.