



Одељење Микробиологије и паразитологије

Број: ЗЦ-02-678

Датум: 19.април 2011. година

## ПРАВИЛНО УЗОРКОВАЊЕ, ЧУВАЊЕ И СЛАЊЕ БИОЛОШКОГ МАТЕРИЈАЛА У ЛАБОРАТОРИЈУ

Микробиолошка дијагностика обухвата: **А) узимање материјала Б) транспорт материјала Ц) обраду материјала** са изоловањем и идентификацијом узрочника инфективне болести и обично са одређивањем осетљивости изоловане бактерије на антимикробне лекове = антибиограм (за бактерије), антимиограм (за гљивице). **БИОГРАМ НЕ ПОСТОЈИ!!! Д) тумачење резултата.**

Узорак је сваки материјал који се узима од болесника и анализира у микробиолошкој лабораторији. За микробиолошки преглед најчешће шаљу следећи биолошки материјали:

1. **Брис:** гуше, носа, назофаринкса, промена на кожи, ране, уха, ректума, ануса, вагине, цервикса, вежњаче ока...

2. **Испљувак (спутум), трахеални аспират, аспират бронха**

3. **Урин**

4. **Столица**

5. **Жуч, трансудат, ексудат, пунктати**

6. **ликвор**

6. **исечак ткива**

7. **сегмент ЦВК (централни венски катетер)**

Узорци се према пореклу могу поделити на : узорке из **примарно стерилних регија:** крв, костна срж, мождане коморе и кичмени канал тј. ликвор, плеурална, перитонеална и перикардна течност, очна водица, синовијална течност, урин, жучни путеви, синусне шупљине, ниво алвеола, средње ухо, ткива без површинског епитела и узорке из регија које су **колонизоване** нормалном (физиолошком) микрофлором: горњи делови респираторног тракта - спутум, дигестивни тракт - фецес, генитални узорци, кожа, вежњача ока

Техничар мора да зна како да технички исправно узме сваки узорак и да то објасни пацијенту. Лекар који тражи бактериолошку контролу одређеног узорка мора да зна патогенезу болести- тј. у којој фази ће се узрочник инфекције наћи у болесничком материјалу: у фази инкубације (период од момента уласка микроорганизма у тело човека до појаве првих симптома болести); у акутној фази инфекције или фази реконвалесценције (опоравка).

Правила за узимање клиничког материјала су:

1. узети **одговарајући узорак - са правога места** тј. узорак који ће репрезентовати одређени инфективни процес (крв за хемокултуру код бактеријемije, спутум код обољења респираторног тракта...).

2. **смањити могућност контаминације** (брис гуше узети са перитонзиларних регија избегавајући контакт бриса са другим деловима орофаринкса; узети брис из дубине ране, а не

са површине због могуће контаминације микроорганизама који чине физиолошку флору коже; пунктирати бризгалицом и иглом садржај-поготову при сумњи на анаеробну инфекцију).

3. придржавати се при узимању, слању и обради **каутела асепсе** да би се заштитио болесник и особа која узима материјал, а то је и једини начин да се добију валидни резултати.

4. **Узети узорак у право време** : код локалних заразних болести материјал се узима чим се појаве први симптоми, са места где се одиграва инфективни процес. Код генерализованих заразних болести врста материјала и време узимања зависе од стадијума обољења. На пример код септикемије узрочници обично доспевају у крв повремено из жаришта сепсе и у њој остају дуже или краће време. Крв за хемокултуру узети кад пацијент осети језу и дрхтавицу (знак уласка микроорганизама у крв) тј. 30-90 минута од скока температуре. Оптимално је хемокултуре узети најмање 3 пута у току дана са размаком од 2-3 сата (размак не сме бити краћи од 1 сат) и поновити 2-3 пута сваког другог дана. Код интермитентне бактеријемije грозница и језа јављају се 1 сат после инвазије микроорганизама у крв па ће узорак крви узет у току или непосредно пре максимално изражене грознице, имати највећи број микроорганизама. После тог времена узорак ће имати мањи број микроорганизама због ефикасног одстрањења бактерија из крви активношћу ћелија ретикулоендотелијалног система (РЕС).

5. узорак узети **пре почетка антибиотске терапије**. Примењену терапију имати у виду приликом тумачења резултата, па је због тога обавезно навести у спроводној листи. Код контроле ефикасности спроведене терапије узорак се узима тек неколико дана (3-4) по њеном завршетку.

6. узети **довољно материјала (довољну количину)** и адекватан **број узорака**. На пример једна негативна **копрокултура** није довољна да би се могао искључити одређени патоген – за то је потребно прегледати 3 узорка столице, а за паразитолошки преглед се препоручује слање 3 узорка у размаку од 2 дана. Мала количина узорка може дати лажно негативан резултат (мали волумен крви садржи мали број бактерија). Вероватоћа изолације узрочника из **крви** је већа што је запремина испитиваног узорка већа, због релативно малог броја микроорганизама присутних код већине бактеријемija. Бактеријемija у деце се разликује од бактеријемije у одраслих у четири главне тачке. А) магнитуда бактеријемije у деце је виша (око 1000 бактерија /мл крви-CFU/ml, а код одраслих 10 CFU/ml, а може бити и 1 бактерија/мл); Б) количина крви за хемокултуру је мања; В) дистрибуција микроорганизама који узрокују бактеријемiju код деце је другачија (*H.influenzae* tip b, *S.pneumoniae*, *N.meningitidis*, *Salmonella* spp., се чешће изолују из хемокултура деце, док су други микроорганизми-облигатни, анаероби, чешћи код одраслих); Г) полимикробна бактеријемija је ређа код деце.

Препоруке су да се код одраслих узме 10-30 мл крви венепункцијом, за инокулацију аеробне и анаеробне боце, а код деце је узимање оволике количине крви немогуће, па се због тога и због већег броја бактерија по мл крви у току бактеријемije добри резултати добијају култивацијом 1-5 мл крви. Ако се пунктира мање од 0.5 мл крви код деце, инокулише се само аеробна боца за хемокултуру јер је анаеробна бактеријемija код њих ретка. Оптимални број узорака крви за хемокултуру је 3 у току 24 часа, односно 2-3 узорка по септичној епизоди за одрасле.

7. користити **транспортни медијум**

8. клинички узорак **исправно обележити** (налепница са именом и презименом пацијента, врстом узорка) и доставити лабораторији са **спроводном листом**.

9. узорак **брзо транспортовати** до лабораторије: за мање узорке 15-30 минута; биоптички материјал за 20-24 часа; за већину узорака 6 часова. Транспорт је добар ако се очува

вијабилност микроорганизама и заштити међусобни квантитативни однос микроорганизама у узетом материјалу. Ако материјал није могуће транспортовати, треба га **заштитити (презервирати)** - сачувати присутне микроорганизме до тренутка обраде материјала у лабораторији (у фецес додаје се конзерванс –0.033М пуфер натријум или калијум фосфат и 5% глицерол АА). Микробиолошку анализу би требало спровести одмах, а најдуже у току 24 часа од тренутка узимања материјала. За то време се узорци чувају на: **+4<sup>0</sup> С (у фрижидеру)**-урин, спутум, перикардна течност, бронхијални испирак, катетери, исечци ткива, серум; **25<sup>0</sup>С (собна температура)**: ликвор, синовијална течност, жуч, костна срж, назофарингеални брис, материјал из ока, гениталног тракта, унутрашњег уха, при сумњи на анаеробну и гонококну инфекцију; **37<sup>0</sup> С (у термостату)**: узорци који су већ засејани на хранљиве подлоге (хемокултуре, урикулт за урин..). Ако немамо одговарајућу транспортну подлогу која обезбеђује анаеробне услове, материјал узети бризгалицом и иглом, по узимању истиснути ваздух, ставити поклопац на иглу и материјал послати до лабораторије, не касније од 20 минута. Материјал посебно означити, јер мора да има приоритет у транспорту и накнадној обради.

✓ Узорци морају бити прописно затворени, запаковани, не само да не би дошло до контаминације материјала током транспорта, већ и да особе које рукују са материјалом не би биле изложене ризику од инфекције.

#### ТЕХНИКА УЗИМАЊА МАТЕРИЈАЛА:

Материјал се узима: стерилним брисевима или другим стерилним инструментима :бризгалица, бактериолошка еза, катетери, ендоскопи, пинцете итд. Брисеви се најчешће користе. **Сувим брисем** се узима материјал са површине слузница и коже где постоји обилна секреција. Ако је секреција оскудна, брис пре узимања навлажити у стерилан физиолошки раствор или стерилан глукозни бујон. **Овлажени брисеви** служе и за узимање узорака са предмета.

**Усна шупљина** је изложена сталној контаминацији са различитим микроорганизмима који у њу доспевају инспирисаним ваздухом, респираторним секретом, са храном, водом, рукама и предметима који се стављају у уста. Највише микроорганизама има ујутру пре доручка, после доручка се тај број смањи, и микроорганизама има све мање до вечере када број порасте и после тога пада. У току ноћи према јутру њихов број се повећава. Разна антисептичка средства (делови пасте за зубе), дим цигарете смањују број микроорганизама усне дупље, док антибиотици смањују само поједине врсте бактерија. Због наведеног је важно да се брис гуше и носа узима ујутру, пре доручка или да особа минимум 1 сат пре тога није ништа јела, пила, пушила цигарете.

**Спутум (испљувак)**: се узима код запаљенских процеса у респираторном тракту. Узима се јутарњи испљувак јер се током ноћи кад човек мирује сакупи највише материјала и бактерија у респираторном тракту. пацијенту се каже да испере уста млаком водом без трагова дезинфекцијних средстава, затим да се јако накашље «из дубине» и садржај испљуне у стерилну посуду са широким отвором. Због могуће контаминације испљувка бактеријама које колонизују слузокожу горњег респираторног тракта, и ради поређења микрофлоре гуше са налазом у спутуму од истог пацијента се узима и **брис ждрела**. Код одојчади и мале деце која не искашљавају, уместо спутума се узима **испирак желуца** (аспирација прогутаног садржаја) или брис гуше. Код сумње на туберкулозу се узима јутарњи испљувак (5-10 ml) у току 3 узастопна дана, а не више од 5-6 узастопних дана; код деце узимати испирак желуца током 3 узастопна дана ујутру (5-10 ml течности).

**ФЕЦЕС**: се узима непосредно после дефекације која је обављена у стерилном или добро испраном, чистом суду без трагова дезифицијенаса. Узима се 1-2 грама фецеса помоћу

специјалне пластичне кашичице која је причвршћена за запушач, па се њоме може доzirати узета количина. Бирају се криво, слузави, гнојни делови, јер је већа вероватноћа да се ту нађу узрочници обољења. Посуда се затвори. Столицу транспортовати што пре до лабораторије да се избегну промене реалног односа присутних бактерија ( стајањем столице се смањује рН, а у киселој средини пропадају патогене цревне бактерије-Shigellae, Salmonellae, V.cholerae..). Код одојчади се столица узима са пелене, а некад се као и код одраслих код којих се не може добити фецес узима **ректални брис**. Потребно бактериолошки прегледати најмање 3 узорка столице, а при сумњи на паразитске болести 3-4 узорка столице у размаку од по 2 дана. Фецес се узима током читаве болести и у стадијуму рековалесценције у правилним временским интервалима, све док 3 узастопне копрокултуре не буду негативне.

**Урин** се може узети на 3 начина: **микцијом** (нестерилно), **катетеризацијом** и **супрапубичном пункцијом** мокраћне бешике (стерилан начин). Коришћење перинеалне кесе у дијагнози уринарних инфекција се не препоручује. Пошто је урин одлична подлога за раст и размножавање бактерија, узорак узет било којом методом може стајати на собној температури највише 1 сат, доставља се најкасније за 4 сата, али га је најбоље одмах донети у лабораторију.

Урин се најчешће узима **микцијом**. Узима се први јутарњи урин. Особа опере гениталије (периуретрални простор и перинеум) топлом водом и сапуном, без употребе дезинфекционих средстава примењујући покрете спреда ка позади. Генитални органи се не бришу или се обришу стерилном газом, опеганим пешкиром. За време уринарања се руком лабије раздвоје и први млаз (првих неколико милилитара) урина се не узима да би спрао. већину бактерија присутних у уретри, па се узима други ткз. **средњи млаз урина** у стерилну посуду са широким отвором и адекватним затварачем. У случају тешке клиничке слике не мора се узети први јутарњи урин. Код мушкараца је обично чишћење, прање меатуса уретре непосредно пре уринарања и сакупљање средњег млаза урина обично довољно.

**Катетеризацију** избегавати у колико је могуће због опасности уношења бактерија у бешику из доњих делова уретре и настанка нозокомијалних инфекција. Препорука је да се катетеризација користи само код особа које не могу сами да дају средњи млаз урина. Првих неколико милилитара урина из **новог, тек пласираног катетера** се пуне да оперу евентуално присутне микроорганизме који су колонизовали врх катетера при његовом пласирању. Узорак се узима коришћењем бризгалице и игле. Место пункције се дезинфикује, а урин аспирира кроз мекани гумени конектор који се налази између катетера и уринарне кесе. Урин се **не узима из кесе** за колекцију урина сем код неонатуса или мале деце уз посебне припреме.

Код инфекција уринарног тракта се узима 3 узорка урина. Код сумње на туберкулозу узима се урин добијен катетеризацијом или средњим млазом 3 дана узастопно (40 мл урина). Урин скупљан и току часа, у кесицу за скупљање урина катетером и количина мања од 40 мл – изузев ако није могуће добити већу количину урина, нису прихватљиви узорци.

**Ликвор** је код здравих људи стерилан. Скупља у стерилне епрувете по 1- 2 мл. Ако је могуће **засејати га одмах** - поред болесничке постеље на одговарајуће хранљиве подлоге. Обавезан је брз транспорт до лабораторије јер су бактерије као што су :пнеумокок, менингокок и Naemophilus influenzae врло осетљиви у спољашњој средини и ван организма преживљавају кратко време. Зато епрувету **транспортовати на 37<sup>0</sup>С** , у **руци, цепоу**. Узорак ликвора не чувати у фрижидеру, јер су узрочници осетљиви на ниске температуре.

**Гној** са коже и доступних слузокожа се може узети; брисом, пункцијом, после инцизије или спонтане руптуре. Најбоље је кожу предходно дезинфиковати, па кроз интактну кожу или слузокожу узети гној пункцијом (бризгалицом и иглом), а ако то није могуће-брисем тако што стерилним рукавицама размакнемо ивице ране или направимо инцизију па брис увучемо дубоко

у рану због могуће контаминације узорка физиолошком флором коже. Гној истиснути из бризгалице у епрувету.

**КРВ** се узима за **серолошке анализе** и за **бактериолошки преглед** при сумњи на бактеријемiju и сепсу. Крв здравих људи је стерилна. Пре узимања кожу дезинфиковати 70 % алкохолом, и повидон-јодидом или 2 % јодом. Дезинфикује се површина 5-6 цм око места пункције. Оставити да се осуши, а **вену након дезинфекције више не палпирати**. Користе се стерилне рукавице, рука пацијента се подвезе еластичном повеском изнад кубиталног предела и обави венепункција. По пункцији се јод отклонити 70 % алкохолом. Оптимална количина крви коју треба узети је 10-30 мл за одрасле, а 1-5 мл за децу. По венепункцији се игла замени, дезинфикује отвор-чеп боце, по 5 мл крви се истисне у сваку боцу (аеробну и анаеробну) и добро измеша са 45 мл бујона. Правило је да се узорак крви разблажи у бујону у односу 1:10 да би се неутралисала бактерицидна својства крви (комплемент) и евентуално присуство антимикуробног агенса. **оптимално 3 хемокултуре у току 24 часа, тј 2-3 узорка по септичној епизоди**. Узети их појединачно, а временски размак не сме бити краћи од 1 часа. Узорке узети у тренутку пораста температуре тј. 30-90 минута од скока температуре због највећег броја микроорганизама присутних у крви у то време, а не када је она већ скочила. Узимање крви за хемокултуру путем ЦВК се не препоручује, осим ако вађење ЦВК није пожељно. Култивација се може вршити у стандардним електричним термостатима/инкубаторима или у аутоматизованим система са течним подлогама за култивацију, инкубацију тако узетих узорака и детекцију позитивних узорака на бактерије и гљивице.

**Bact/ALETR 3D** су аутоматски системи који инкубирају, протресају (мешају) и региструју микробиолошки пораст у бочицама са течном подлогом од пацијената са сумњом на септикемију. Бочице су кодиране бојом ради лакше идентификације типа медија и пресвучене викилом због заштите. Колориметријски сензор у бази сваке флашице, открива производњу CO<sub>2</sub> пораста као продукта метаболизма бактерија и гљивица, мењањем боје сензора од плаво-зелене у жуту указујући на позитиван резултат. Инкубација негативних узорака траје 5 дана, а позитиван пораст може се открити после пар сати. *Припрема коже пацијента за венепункцију* је идентична као код стандардних техника култивације крви за бактериолошки преглед, односно хемокултура. Односно састоји се из следећих фаза: 1) по лоцирању вене, чистити место убода 70 % алкохолом минимално 30 секунди; 2) припремити раствор јода ( 1-2 % тинктура јода 30 секунди) и дезинфиковати кожу у концентричним круговима од места убода пречника 1-2 цм; 3) пацијентима осетљивим на јод, очистити кожу само алкохолом у трајању око 60 секунди; 4) сачекати да се кожа осуши на ваздуху пре убода. **Вену не опипавати поново.**

*Припрема флашице са течном подлогом:* 1) прегледати површину флашице, медијум и сензор. Уверити се да је све у реду, сензор непромењен плаво-зелене боје. **Не користити бочице ако су оштећене и ако им је сензор постао жут.** 2) скинути заштитни поклопчић на врху чепа; 3) очистити септум 70 % алкохолом или раствором јода који визуелно потврђује дезинфекцију септума бочице; 4) омогућити 1 минут септуму да се осуши после дезинфекције, а пре инокулације узете крви у бочицу.

За **венепункцију и инокулацију бочица** могу се користити 2 начина:

**1) Метод игле и шприца:** извући одговарајућу количину крви из вене и директно инокулисати шприцем бочице за хемокултуру до одређене запремине. Обавезно заменити иглу на шприцу пре инокулације узете крви у бочицу, да би се смањила могућност контаминације узорка;

**2) Метод вакутајнер системом:** 1) повезати капицу адаптера на прикључак крилца лептира; 2) извршити венепункцију. Када је игла у вени, осигурати је фластером или је

придржавати да се не помера; 3) поставити капицу адаптера на Bact/ALETR 3D септум бочице и притиснути на доле да би дошло до пенетрације и крвног тока држећи капицу адаптера на флашици; 4) након узимања довољне количине крви, уклонити капицу адаптера са бочице и наставити са инокулацијом крви других бочица(ако је потребно) ; 5) ако се узима већа количина крви за друге тестове, положи се уложак адаптера у његову капицу и притиска док не шкљоцне, због компатибилности са вакумским цревом. По завршетку узимања крви од пацијента, склони се капица адаптера са бочице и извади игла из вене пацијента. **Бочице добро протрести, уписати име и презиме пацијента, одељење и време узимања.** Затим их однети до микробиолошке лабораторије, а могу се држати пар сати на собној температури пре инкубације, строго водећи рачуна да не буду изложене сунчевој светлости.

Обратити пажњу на следеће препоруке:

- \* **Препоручује се количина крви у опсегу 1:5 до 1:10.** Ако је запремина узете крви увећана, увећава се и вероватноћа позитивних култура.
- \* **Оптimalно се узима 20 мл крви од одраслог (10 мл по бочици).**
- \* Не препуњати бочицу јер то може да узоркује лажно позитивно читавање апарата Bact/ALETR 3D.
- \* Ради боље контроле запремине, означити ниво са стране бочице пре инокулације крви.
- \* Код коришћења адаптер капица, уверити се да су крилца чврсто повезана и да је игла причвршћена при улазу или излазу из септума бочице, избегавајући увртање или окретање бочице.
- \* Да би се избегла контаминација крвних узорака за хемокултуре, прво треба инокулисати ту бочицу, а затим пунити допунске епрувете за друге анализе крви.
- \* **При попуњавању налепница на бочицама не прекривати бар код ни број партије.**
- \* **Бочице са течним културама се чувају на собној температури ван дејства сунчеве светлости.**

Дакле, за бактериолошки преглед се узимају и шаљу узорци из свих ткива и органа, узети одговарајућим асептичним поступцима који обезбеђују реалан квалитативно-квантитативан налаз добијен у чистој или мешовитој примокултури односно омогућавају издавање валидних резултата.

Кабинет за надзор над болничким инфекцијама и контролу стерилизације