

Institut za belodrobni zaboluvawa i tuberkuloza
Referentna laboratorija

PRI RA^NI K

ZA RABOTA VO LABORATORI I TE ZA BAKTERI OLO[KA
DI JAGNOZA NA TUBERKULOZATA - KULTURI

Skopje
2007

SODR@I NA

- 1.Voved
 - 2.Prostor i oprema vo laboratorijata za kul turi
Organi zaci ja na prost orot vo laborat ori jat a
 - 3.Zemawe na pri meroci
 - 4.Transport na pri meroci te
 - 5.Obrabotka na pri meroci te
 - 6.Homogeni zaci ja i dekontami naci ja
Homogeni zaci ja so natri um hi droksi d.
Metoda na homogeni zaci ja so pri mena na N-Acetil-L-Cistein NaOH
(NALC-NaOH)
Metod na homogeni zaci ja so zef ari n tri natri um fosfat
(Z-TNP)
 - 7.Podl ogi za kul ti vi rawe
Leven{ tajn - Jensenova podl oga
 - 8.Zasaduvawe i inkubaci ja
 - 9.Evi denti rawe na naodot i i zvestuvawe
 - 10.Kontrol a na kval i tetot na rabotat
 - 11.Kori stena l i teratura
- Pri l ozi : A. Obrazec za barawe za kul turel no i spi tuvawe
B. Obrazec od kni ga za kul tura

1. VOVED

Diagnostična mikroskopija je osnovna bakteriološka metoda za diagnosticiranje tuberkuloze, no taa, iako je brza in efektivna, nima velike specifičnosti in ni mogoče zagotoviti identifikacije tuberkuloznih bacilov.

Definitivna diagnostična metoda za TB zaviš od izolacije in identifikacije patogenov, a soodvetni terapevtski režimi zaviš od rezultatov testov na občutljivost. Kulturna gozgotemiva brojna metoda za tuberkulozo za 30 - 50%, se odkrivaat slaba porano, -esto pred da stanat zarazni za okolnata. Za pozitivna kulturna dovolno je pri stvo na nekaj bacilov (10 -100). Zato kulturna je neophodna kako bakteriološka metoda za diagnosticiranje na vonbel odrobnata in detskata tuberkuloza kade pri merocitih običajno sodrat mal brojna bacilov.

Zaradi bavnato razmnoževanje na bacilov, 18-24 urasa, potrebno je podolgo vreme za dobivanje na kulturna. Na tvrditih podlogah kulturna se dobi va za 3 do 8 tednov, a v te-ritih podlogah za dve tednov pomalje.

M. tuberculosis je bakterija koja je prebriliva v odnosu na hranilnata podloga in raste samo na obogatitih podlogah so jajca in so aluminij.

Uvedevaweto na samata metoda bara poveže oprema in dobro obnaden kadar.

Diagnostična mikroskopija in kulturna zaedno, kako dve osnovni bakteriološki metodi obezbedevaat brza in definitivna diagnostična na tuberkulozo, a so testov na občutljivost dopri nesuvaat v spre-uvaweto na nastanuvaweto na multirezistentna tuberkuloza.

2. PROSTORI OPREMA VO LABORATORIJE ZA KULTURA

Tuberkuloza je zarazna boleest koja nastanuva aerogeno, so inhalacijana in fektivnitate -estiki, i zato je neophodno koga se raboti kulturna, odnosno izolacijana bacilov, da se prevzemati te neophodni merki za kontrola na infekcijata kako bi se spre-ilo zarazuvaweto na zdravstveni osobnal.

Laboratorijata za kulturna sekogaj treba da bi de odvoena laboratorijata.

Osventoa to podotividovite v laboratorijata treba da bidat od materijal tolesno se -isti, mnoge bitnaventilacijata na prostoriata.

Ventilacijata treba da obezbedi postojana izmena na vozduhot od laboratorijata i toa 6-12 pativo tek na 1 -as za da se odstranat 99% od infektivnitate -estiki v vozduhot.

Dvi`eweto na vozduhot treba da bide vo pravec od po~isti ot del kon pozagadeni ot. Potencialno kontaminirani ot vozduh, koj se isfrla vo nadvore{ na sredina, bi`trebal o da se isfrla na visi na od najmal ku 3 metri nad zemjinata povr{ina.

2.1. Organi zacija na prostoro t vo laboratorijata

Administrativni del

Pri merocite za analiza vo laboratorijata se pri maat preku {al teri se stavaat na pri emnata rabotna masa. Tuka sekoj pri merok se proveruva dali e pravi lno obel e`an i ako sadot vo koj se nao|a pri merokote zagaden odnadvor, se vr{ i dekontaminacija so 5% fenol . Potoa se proveruva dali se sovpa|aat podatocite od sadot so pri merokote sprovdnata lista. Otkako pri merokote }e se zavede vo laboratori ski ot registar pri merokote se prosleduva za ponatamo{ na obrabotka vo drugi te del ovi od laboratorijata.

Gl avni ot laboratori ski del vo koj se nao|a pogol emi ot del od neophodnata oprema i vo koj se vr{at site potrebni aktivnosti kako: izrabotka na direktnite preparati, homogenizacija na pri merocite, kultivirawe i inkubacija. Opremen e so laboratori ski masi, gol em fri`ider, lavabo so slavi na {to se otvara so lakti thermostat.

Del ot zai zol acija e obi ~no mestoto kade se raboti so zarazen materijal i kade se nao|aat bezbednosni te kabini i centrifugata.

Prostorot za ~itawe slu`i za mikroskopi rawe na preparatite i za ~itawe na kulturate. Tuka se popolnuvaat i listite so dobi enite naodi i se vra{aat vo administrativni ot del kade se zaveduvaat vo laboratori ski ot registar. Opremena e so: rabotni masi, mikroskop, lavabo.

Peralna Toa e prostori jata vo koja se pere staklari jata posle avtokl aviraweto. Vo ova prostori ja se nao|a gol em sadomija~ od ~elik {to ne r|osuva, avtoklav, destil ator, sterili zator, rabotna masa.

Kujna e poseben prostor vo koj se pri premaat podlogite, dokol ku ne se kori stat komercijalno obezbedeni podlogi. Taa ima sadoper, rabotna masa, pe~ka koagulator, fri`ider, mikseri dr.

Oprema

Bezbednosni kabini .

Bidej}i **Mycobacterium tuberculosis** spored rizikot od infekcija e klasi fici ran vo Rizina Grupa **III**, raboteweto so pri merocite koi mo`at da go sodr`at bacilot treba da se sproveduva vo bezbednosni kabini. Ovie kabini imaat HEPA filtri koi zadr`uvaat infektivni ~esti ~ki so

gol emi na od 0,3 mm ({ to vkl u- uva bakteri i , spori i vi rusi) so efi kasnost od 99,97%.

Na toj na- in se za { ti tuva zdravstveni ot rabotnik i negovata okol i na, a mo` e da se za { ti ti i pri merokot od zagaduvawe.

Za tuberkul oznata bakteri ologija soodvetni se klasa **I** i klasa **II** na Bi ol o { ki bezbednosni ot kabi net.

I dealno mesto za postavuvawe na bi ol o { ki bezbednosni ot kabi net e podaleku od vlezna vrata na laboratorijata za da ne se preki nuva strueweto na vozduhot vo nego pri vl eguvaweto vo prostori jata.

Centri fuga

Centri fugata e osnovna oprema vo laboratorijata za kultura. Vo bakteri ol o { kata laboratorija za tuberkuloza se prepورا- uva centri fuga koja ima za { ti ten kapak, fi ksi ran agolen rotator i stabi lni l e` i { ta za centri fugi rawe. Vakov vid na rotator ovozmo` uva stabi lno centri fugi rawe na epruveti te, bez opasnost od kr { ewe i koga postojat razli ki vo te` ini te na epruveti te koi se centri fugi raat i stovremeno. Po` el no e centri fugata da ima bezbednosni kapak so el ektronska kontrol a, koja go spre- uva otvaraweto dodeka raboti rotorot.

^ estopati se sugeri ra sedi menti raweto na homogeni zi rani te pri meroci da bi de na odrede n broj na rotaci i vo mi nuta, { to e dosta nepreci zno. Ne e bi ten samo brojot na rotaci i te tuku i radiusot. Zatoa apsolutnata gravi taci ona si l a koja se posti gnuva pri centri fugi raweto najdobro e da bi de i zrazena kako rel ati vna centri fugal na si l a.

Pri mena na centri fugal na si l a od 3000kg, vo tek na 15 mi nuti ovozmo` uva efi kasnost od centri fugi raweto od 95%.

Vo tekot na centri fugi raweto dokol ku centri fugata nema si stem za l adewe temperaturata vo epruveti te mo` e zna- i tel no da se poka- i i da del uva i nhi bi torno na bakteri i te pa poradi toa se prepورا- uva centri fugi raweto da ne trae podol go od 15 mi nuti . Potrebno e da se kori stat epruveti so navoj. Pred da se zapo- ne so centri fugi raweto treba da se prover i bal ansot na epruveti te, za da ne dojde do kr { ewe na epruveti te. Ako si te mesta ne se popol neti , za bal ans se stava epruveta so al cohool . Vo tekot na raboteweto centri fugata ne treba da se dopi ra zatoa { to mo` e da nastane povreduvawe i l i da se i zme { a i zdvoeni ot sedi ment.

Inkubator za 35-37°C

Kul turi te za **M.Tuberculosis** se inkubi raat na 35-37°C 8 nedel i . Postojat inkubatori so najrazli - na gol emi na koja se odbi ra spored prostorot i obemot na rabota. Podobro e inkubatorot da e pogol em zatoa { to toga { i ma pomali varijaci i vo temperaturata pri otvarawe na inkubatorot. Treba da se kori stat perfori rani pol i ci i da ne se prepol nuva inkubatorot za da ima struewe na vozduhot, a so toa } e ima i pomali varijaci i na temperaturata. Ako ima gol em broj na kul turi treba posebna prostori ja da se kori sti kako inkubator. Taa ne treba da ima prozorci , zi dovi te i tavanot

treba da se dobro izolirani, a podot da e oblo` en so drvo i rabovite na vratata da se oblo` eni so guma. Se zagreva so kalori fer ili cefki, a polici te po` elno e da se metalni, a ne drveni da ne se nafatat gabi.

Pe-ka za podlogi

Za da se pripremat zakoseni cvrsti podlogi koi sodr` at jajca potrebna e odredena temperatura koja treba da e konstantna, da ne bi de previ soka, a i stovremeno da se i zvr{ i cel osna koagulacija na podlogata vo epruvetata.

Za taa cel e potrebna pe-ka koja mo` e da postigne i postojano da odr` uva temperatura od 80-85°C vo tek na 45 min.

Modernite pe-ki se zagrevaat so cirkulirawe na topol vozduh, a temperaturata se kontrolira so termostat. Vo niv se smesteni polici od `i-ana mre`a zakoseni pod agol od 5-10°, koi le`at na lizga- i ovozmo` uvaat lesno izvlekuvawe na policite za vadewe i stavawe na epruveti. Na ovoj na~in se dobi va potrebnata kosi na na podlogata. Se preporeva pe-kata da bi de zatvorena so staklena vrata i da bi de zagreana delumno pred da se stavat podlogite za koagulacija.

Avtoklav

Postojat dva tipa na avtoklavi: vertikaleni i horizontaleni i so razli~en kapacitet, sprema potrebite.

Naj-est e vertikalni ot tip. Toa e ovalna, vertikalna metalna komora so jak metalen kapak i naj-esto se zagreva so vodena para. Pareata se dobi va so zagrevawe na vodata vo dolni ot del od avtoklavot i toa zagrevawe mo` e da e so gas ili so elektri~en grea~. Ima monometar i sigurnosen ventil pri cvrsten na kapakot.

Vo horizontalni ot avtoklav prostorot mo` e da se i skorsti poracionalno.

Vodeno kupatilo

Vodeno kupatilo slu`i za zagrevawe na epruvetite do potrebnata temperatura pri izveduvawe na bi ohemi skite testovi za identifikacija na mikobakteriite. Vo nego se koristi destilirana voda i pri rabota treba da e zatvoreno so kapak za odr` uvawe na konstantna temperatura.

Plamenci

Slu`at za `arewe na ezi te i treba da bi dat oblo` eni so za{ titen kapak. Ima i elektri~ni gora~i na ezi koi se preporevaat za rabota vo bezbednosnite kabini.

Laboratorski potro{ en materijal (staklo i plastika)

- Laboratorski epruveti
- Laboratorski { i { i wa za te~ni podlogi
- Pasterovi pipeti
- Graduirani pipeti
- Gumeni pumpici za pipeti

- Ezi za i nokul aci ja
- [tenderi i korpi

3.ZEMAWE NA PRI MEROCI

So di rektnata mikroskopija mo`e da se vidat bacilite koi ja predi zvi kuvaat tuberkul ozata, a so ni vna i zol aci ja vo ~ista kul tura tie mo`at da se identi fici raat so { to se postavuva to~na dijagnoza i da se i spi ta ni vnata osetli vost prema anti tuberkul oti ci te. Toa pak ovozmo`uva soodvetna terapija na pacientot i spre~uvawe na multi rezistentnata tuberkul oza.

Kakvi }e bidat rezultate od ovie dve osnovni bakteriolo{ki metodi za dijagnoza na tuberkul ozata zavisi od toa kakov e primerokot, odnosno rezultatot e tol ku dobar kol ku { to e dobar pri merokot.

Bi dej}i naj~esta e bel odrobnata tuberkul oza, vo 85% od slu~ai te naj~est materijal za bakteriolo{ka dijagnoza za tuberkul oza e sputumot. I kaj vonbel odrobnata tuberkul oza po`elno e da se napravi bakteriolo{ka anal i za na sputumot.

Sputum (i ska{ l ok) kako pri merok

- Najdobro e da se zeme utri nski sputum od tri posledovatel ni dena. Najdobro e eden pri merok da se ostavi koga paci entot }e dojde vo laboratorija, eden naredni ot den (utri nski od doma) i eden koga }e dojde povtorno vo laboratorija. Osobeno e bitno kaj HIV poziti vni te da se dobij at dva utri nski zaradi toa { to se si roma{ ni so baci li . Treba da se nastojuva materijal ot navi sti na da e sputum, a ne saliva odnosno da e od dol ni te respi ratorni pati { ta. Zdravstvenoto li ce treba da mu objasni na paci entot kako da go ostvi sputumot. Treba najprvo da ja i spl akne ustata so voda, a potoa da se i ska{ la i da ostavi sputum vo kontejnerot. I ska{ l uvaweto treba da bi de vo prostori ja za i ska{ l uvawe i li na otvoren prostor, a ne vo toaleti te i hodni ci te. Pri pri emot vo laboratorija na pri emni ot obrazec se zabel e` uva makroskopski ot i zgl ed na materijal ot: gnoj av, krvav, sal i va. Potrebna kol i ~i na e 3-10 ml . vo kontejner od 50 ml . Toj treba da bi de:
 - steri len, so kapak na navoj.
 - So { i rok otvor za l esno da se ekpektori ra
 - Napraven od proyiren materijal za da mo`e da se vi di kvanti tet i kval i tet na sputumot
 - Zi dovi te da se takvi da na ni v l esno mo`e da se bel e` i
 - Mo`at da se kori stat kontejneri za povtorno upotreba posl e ~i stewe i steri li zaci ja so vri ewe najmal ku 30 mi nuti . Materijal ot vedna{ se dostavuva vo laboratorija i li se ~uva do nekol ku dena vo fri `i der. Ako paci entot ne mo`e da i ska{ la dobar materijal , a se somnevame deka se raboti za TB mo`e da se zeme induci ran sputum. Toa se

i zveduva vo prostori jata za i ska{ luvawe so i nhal acija na 3-15 % na zagrean solen rastvor. Pri toa treba da se obezbedat neophodni te higienkotehni ~ki za{ titni merki. Posle i nhal acijata bi dejki paci entot }e i ska{ luva pove}e, mo` e da se zemat pove}e pri meroci . Ovoj sputum e pote~en i na upatot se zapi { uva deka se raboti za i nduci ran sputum.

Vo kol ku i na ovoj na~i n ne dobi me kval i teten sputum mo` e da se dobi e material so poinvazivna metoda kako { to e bronhoskopijata. Taka se dobi vaat:

- Bronhoaspirati bronhoalveolaren lavat. Treba da se naglasi deka treba { to pomal ku da ima anesteti k bi dejki toj go i nhi bi ra rastot. Osnovno e pri izveduvawe na bronhoskopijata da ne nastane kros kontami nacija so tuberkul ozni ot baci l. Posle bronhoskopijata od gol ema vrednost e i i ska{ lani ot sputum.
- Gastri ~en lavat se zema kaj deca koi go progol tuvaat sputumot. Isto taka se zemaat tri posledovatel ni utri nski i mora da se odnesat vo laboratorija za 4 ~asa ili se dodava natrium karbonat za neutral izacija, kol i ~i na 20-50 ml .
- Likvor se zema koga se somnevame deka se raboti za TB meni ngi ti s. Neophodna kol i ~i na e 5ml , a po` el na e 10-15 ml . Toj vedna{ se nosi vo labaratorija za obrabotka. Vo ponovo vreme mol ekul arni te metodi ja zgolemuvaat mo` nosta i go skratuvaat vremeto za dobi vawe na poziti ven rezul tat od likvor.
- Urinata kako materijal isto taka e si roma{ na so baci lli i nema vi sok procent na izolacija. Potrebno e da se zeme utri nska urina, sreden mlazi od tri posledovatel ni dena, kol i ~i na 40-300 ml i vedna{ se dostavuva vo laboratorija
- Krv i feces kako materijal i za TB se zemaat samo od paci enti so HIV.

Krvta se zema vo posebni epruveti i mo` e da se ~uva na sobna temperatura do obrabotkata.

Materijal i mo` at da se zemat so:

- biopsija ili punkcija od razni tkiva i telesni te~nosti. Pri toa treba da ima dovolno materijal i ako e potrebno da se dodade anti koagul antno sredstvo (10 -15ml), a na tki vata da ne se i su{ at i m se dodava fi zi ol o{ ki rastvor. Materijal ot vo steri len kontejner vedna{ se i spra}a vo bakteri ol o{ kata laboratorija.
- Bri sevi te kako material za dijagnoza na TB ne se dobri zaradi hidrofobnosta na mikobakteri i te. Zaradi voso~nata obvi vka baci l i te ne mo` at da premi nat od bri sot vo podlogata.

4. TRANSPORT NA PRI MEROCITE

Pri merocite za bakteri ol o{ ka dijagnoza treba da se dostavat vo laboratorija vo najkratok mo` en rok. Sputumot kako naj~est materijal se

dostavuva vedna{ , a dokol ku toa ne e mo`no, se -uva vo fri`ider se do transportot. Urinata, gastri -ni ot lavat, fecesot koi se osobeno bogati so bakterii treba vedna{ da se dostavat vo laboratorija za da ne se namno`i bakteriskata flora do toj obem da ne mo`e da se dekontaminira.

I sprawaeto na primerocite treba da e vo soglasnost so doma{nata i me|unarodna zakonska regulativa na transportna zarazni materijali.

Neophodno e trojno pakuvawe, pri {to pokraj primarni ot kontejner potreben e u{te edeni dopolnitelna nadvore{na opakovka. Me|u obivkite potreben e da ima dovolnovpi va~k hartija {to }e go sobere materijalot vo slu-aj na nesre}a.

Zaedno so spakuvani ot materijal se i sprawaat upatite za laboratorija koi se smestuvaat odvoeno od kontejnerot so primerokot. Podatocite vo nego treba da se usoglaseni so zabele`anite podatoci na sami ot kontejner.

5. OBRABOTKA NA PRIMEROKOT

Pri em vo admi ni strativni ot del

Primerocite za analiza vo laboratorijata se primaat preku {alteri se stavaat na priemnata rabotna masa. Tuka sekoj primerok se proveruva dali e pravi lno obel e`ani ako sadot vo koj se nao|a primerokot e zagaden odnadvor, se vr{i dekontaminacija so 5% fenol. Potoa se proveruva dali se sovpa|aat podatocite od sadot so primerokot i sprovdnata lista. Otkako primerokot }e se zavede vo laboratori ski ot registar, isti ot se prosl eduva za ponatamo{na obrabotka vo drugite del ovi od laboratorijata.

Koristewe na bezbednosna kabi na

Poradi zgol emen rizik od produkcija na infektiivni aerosoli , za vreme na pri premawe na primerokot za kul tivirawe, se preporeuva si te proceduri da se izveduvaat vo specijalni bezbednosni kabini za rabota so zarazen materijal. Nottie ne obezbeduvaat apsolutna za{titati mo`e da dojde do infekcija ako vo nea ne se raboti po propi {anata procedura. Kabini te se predvideni za rabota vo tek na 24 -asa i ne se preporeuva da se iskl u-vaat za da ne se promenat uslovi te vnatre vo istata. Pred da se po~ne so rabota vo nea prpora~livo e taa da raboti najmal ku 5 minuti pred toa. Rabotnata povr{i na, predni ot yidi predni ot prozor treba da se izbri {at so dezinfi cients, a potoa so steril na voda.

Vokabinata se smestuvaat samo potrebni te raboti. Otkako }e se vnesat racete vo kabinata, se po~ekuva 60 sekundi pa se po~nuva so rabota. Vokomorata treba da ima i vpi va~k hartija za pobrzo da se is-i sti , a potoa da se avtokl avira.

Opremata koja proizveduva aerosoli (pr. vorteks) se postavuva {to podal eku od predni ot yid.

Sl ednite manipul aci i treba da se izbegnat za da ne dojde do naru{uvawe na funkcijata na kabinetot :

- Stavawe na materijal ot za avtokl avirawe nadvor od kabinata

- Postavuvawe na kontejneri te so pi peti vo i spravena polo`ba vo kabina i li na podot nadvor od nea.
- Da se upotrebuvaat samo horizontalni kontejneri za pi peti, koi se i spolneti so dezinficiensi (5% fenol).
- Pravi lno da se i zveduvaat bakteriolo{ki te tehniko so cel da ne se formiraat aerosoli.
- ~isti te predmeti vo kabina da se postavuvaat na rastojanie od najmal ku 12 sm od mestoto na rabota so zarazen materijal za da ne dojde do kontaminacija.
- Po zavr{enata rabota vedna{ da se zatvorat kontejneri te i epruveti te.
- Da ne se koristi gol em otvoren plamen na plameni kot bi dej}i toa predi zvi kuva turbulenci ja na vozduhot vo kabinetot.
- Kori stete te-en dezinficiens (5% fenol) za dezinfekcija na cel i ot kontaminiran pri bor pred da go i zvadi te od kabinetot i li stavete go di rektno vo sad za avtokl avi rawe koj se nao|a vo kabinetot.
- Na krajot od sekoj raboten den i zbri {ete ja rabotnata povr{ina so dezinfekciono sredstvo.
- Pred da se menuvaat HEPA filtri te treba da se napravi cel osna dezinfekcija so gas-formaldehid.

Upotreba na centri fugata

- Sekoga{ se koristat dve isti epruveti za centri fugi rawe koi se stavaat edna nasproti druga. Vo edna e pri merokot, vo drugata se stava 70% al kohol.
- Se proveruva dali e dobro i zbalansi rana centri fugata.
- Se zatvora kapakot, se proveruva dali brzinata e na nula, pa se podesuva brzinata na svrtuvawata i potrebnoto vreme.
- Sekoga{ treba da se sl edi upatstvoto na proi zvodi tel ot.

Upotreba na avtokl avot

- Vo avtokl avot sekoga{ treba da i ma dovol no koli ~estvo voda.
- Po vkl u~uvaweto na avtokl avot se gleda postignuvaweto na temperaturata i pri ti sokot.
- Vremeto na sterilizacija zavisi od toa {to se sterilizira.
- Po zavr{uvaweto na sterilizacijata ne se otvara avtokl avot dodeka ne se oladi i padne pri ti sokot na nula.
- Sekoga{ se sl edi upatstvoto na proi zvodi tel ot.

Merki na pretpazli vost

Ni koga{ da ne se otvora avtoklavot ako temperaturata i znesuva e 80°C zatoa { to mo` at da nastanati seri ozni opekotini na racete i liceto. Te-nosta vo { i { i wata mo` e da dostigne temperatura i nad 100°C i pri kontakt so sobna temperature i sti te mo` at da eksplodi raat.

6.HOMOGENI ZACI JA I DEKONTAMINACI JA

Sputumot e kontaminiran so drugi bakterii i zatoa sekoga{ pred da se zasadi na podloga treba da se homogenizira i dekontaminira. Postapkata treba to-no da se izveduva zatoa { to mo` at da se uni { tati tuberkulozite bacilli dokolku gi ima. Sekoga{ se homogenizira celiot materijal. Se homogeniziraat tolku primeroci kolku { to imamestavo centri fugata. Treba da se izbegnuva prefrlaweto vo epruveti zaradi mo` nost od kontaminacija. Najdobro e da se koristat kontejneri - epruveti pa po homogenizacijati sti te da se postavat vo centri fugata.

Drugite materijali, osven sputumot, baraat u{ te povni matelna obrabotka zaradi maloto kol i -estvo na bacilli { to mo` e da go sodr` at. Postojat pove}e metode na homogenizacija i neutralizacija.

6.1 Homogenizacija so natriumhidroksid.

Ovoj metod naj-esto se koristi zaradi ednostavnosti reagensite koi mo` at lesno da se nabavat. **NaOH** e toksien kako za druge bakterii taka i za tuberkulozite bacilli i zatoa mora to-no da se izveduva postapkata.

Reagensi

4% NaOH

NaOH

4g

Destilirana voda

100 ml

Natriumhidroksidot (proanalizi) se rastvara vo destilirana voda i se sterilizira so avtoklavirawe na 121°C vo tek na 15 minuti.

Rastvor na NaCl

NaCl (proanalizi)

0,85g

Destilirana voda

100ml

Natriumhloridot se rastvara vo destilirana voda i se avtoklavira na 121°C

I zveduvawe

- Na sputumot vo kontejnerot mu se dodava dupla količina od 4% NaOH.
- Se zatvara kapakot na kontejnerot i se protresuva.
- Se ostava na sobna temperatura 15 minuti so povremeno protresuvawe
- Se centri fugira na 3000hg vo tek na 15 minuti
- Se odliva supernatantot
- Se dodava 15 ml fiziološki rastvor
- Se centri fugira na 3000hg vo tek na 15 minuti
- Se odliva supernatantot, a tal ogot vedna se zasaduva na podlogata.

Prednosti na ova metoda :

- Metodata e ednostavna, efektivna i efikasna.
- Potrebno vreme za obrabotka e 20 minuti.
- Sterilizirani od NaOH moze da se čuva podolgo vreme.

Ograničuvawa :

- Vremeto predvideno za homogeni zaci ja ne smee da se prodolži.
- Ova metoda e dosta gruba i so nea moze da se uništati do 60% od mikobakteriite vo primerokot.

6.2 Metoda so homogeni zaci ja so pri mena na **N-Acetil-L-Cistein NaOH (NALC-NaOH)**

Mukolitični agens **NALC** ovozmožuva natriumhidroksid da se koristi vo povišna koncentracija -1%.

Ako pravilno se izveduva, ovoj metod dava pogolemi brojevi zolacii zatoa što ubiva okolu 30% od mikobakteriite.

Vremeto potrebno za obrabotka na eden primerok e približno 40 minuti i okolu 20 primeroci moze da se obrabotat za 60 minuti. **Acetil cisteinot** ja gubi svojata aktivnost ako stoji podolgo vreme i zatoa treba sveđ da se pri gotvuva sekojdnvo. Sedimentot dobien so centri fugiraweto treba da se razredi so destilirana voda vo odnos 1:10 za da se namali toksično dejstvo na komponenti te od rastvorot koj gi nhi bi raat rastot na mikobakteriite.

6.3 Metoda na homogeni zaci ja so zefarin tri natriumfosfat (Z-TNP)

Upotrebata na zefarinot (**benzalkonium hlorid**) za homogenizacija na sputumot e poprecizna metoda. Ne e ograničeno vreme na deluvaweto na sputumot. Se očekuva da se uništati 30% od mikobakteriite. Potrebno vreme za izveduvawe e 20 minuti, a za 20 primeroci 4-asa. Ova metoda ne e pogodna za poveќеzagadeni primeroci.

Homogeni zaci ja na drugi materi jal i

Gastri -ni ot lavat , naj-esto ako e zemen vo sterilen kontejner, nema potreba da se dekontami ni ra bi dej}i vo sprotno tuberkul ozni te baci li }e bi dat uni { teni . Se centri fugi ra na 3000 g vo tek na 15 mi ni se zasaduva sedi mentot. Ako se somnevame za kontami naci ja, sedi mentot se me{ a so 2ml na 4% sul furna ki sel i na, se ostava da stoi 15 mi nuti , se neutral izi ra so 4% **NaOH** koja sodr` i fenol crveno kako i ndikator i vedna{ se zasaduva na podlogata.

Uri na

Celata koli -i na se centri fugi ra na 3000g, 15 minuti. Se isfrla supernatantot i na sedi mentot se dodava 2ml - 4% sul furna ki sel i na. Se ostava da stoi 15 mi nuti , potoa se dodava 15ml fiziolo{ ki rastvor i povtorno se centri fugi ra. Sedi mentot se neutral izi ra so 4% **NaOH** koj sodr` i fenol crveno kako i ndikator i vedna{ potoa se zasaduva na podlogata.

Lari ngeal en bri s

Brisot se potopuva vo 5% oksalna ki sel i na, potoa se prefri la vo druga epruveta koja sodr` i sterilen fiziolo{ ki rastvor, po nekol ku mi nuti se vadi , se ostava da se iscedi i so nego se vr{ i zasaduvawe na podlogata. Oksalnata ki sel i na vo koja stoel bri sot se centri fugi ra, sedi mentot se i spi ra so fiziolo{ ki rastvor, povtorno se centri fugi ra i se zasaduva na podlogata.

Tki vo

Limfni `lezdi , bi opsi i i drugi hi rur{ ki resekcii na tki va treba da se ise-at na si tni del -i wa so sterilen skal pel ili no` i ci . Homogeni zaci jata se fr{ i vo porcelansko avan-e so dodavawe na 0,5 - 1ml sterilen fiziolo{ ki rastvor i sterilen pesok ako e potrebno razbi vawe na tki voto. Ako procedurata e izvedena sterilno mo` e direktno da se zasadi na podlogata, a ako se o-ekuva kontami naci ja se dekontami ni ra so 4% sul furna ki sel i na.

Sadovi te koi se kori stel e treba temel no da se i zmi jat i sterili zi raat.

Gnoj

Se tretira isto kako ostanati te aspirirani te-nosti , a ako e gust se homogeni zi ra kako sputumot.

Likvor

Treba da se obraboti so membranska filtracija, so ul tracentri fugi rawe ili so preci pi taci ja. Preci pi taci jata mo` e da se i zvede so dodavawe na 0,1 ml na zaja-ki serum ili ekvi val enten albuminski rastvor za sekoi 10 ml

likvor. Se me{ a se dodeka ne se dobie homogeno zamatuvawe, potoa se centri fugi ra na 3000g, 15 mi nuti i sedi mentot vedna{ se zasaduva.

Drugi telesni te-nosti

Mukopurulentni te-nosti, se tretiraat kako sputum

Bistri te-nosti: Ako se zemeni asepti~no, se centri fugi raat i sedi mentot di rektno se zasaduva, a ako ne se tretiraat kako gastri~en lavat.

Dekontaminacija obi~no ne e potrebna za slednite primeroci :

- Likvor, si novijalna te-nosti drugi telesni te-nosti
- Koskenasr`
- Gnoj od adenapsces
- Hirur{ki resekcioni primeroci (nonei od autopsija)
- Materijal dobi en od pl evra, limfna`lezda, biopsija
- Ako postoji somnena za kontaminacija, eden del od pri merokot mo`e da se zasadi na obi~ni bakteriolo{ki podlogi za da se vidi dali se pri sutni drugi bakterii, a ostanati ot da se ~uva do naredni ot den, pazavi sno od dobi eni ot rezultat soodvetno da se obraboti .

7. PODLOGI ZA KULTIVIRANJE

Definitivnadi jagnoza na tuberkulozase postavuva so izolacija na **M. tuberculosis** i negova identifikacija. No ovaabakterija e izbiriva vo odnos na hrani telni te podlogi . Podlogi te koi se koristat za izolacija namikobakteriite mo`at da bidat selektivni i neselektivni , tvrdi i te-ni podlogi . Te-ni te podlogi obi~no se koristat za brzai izolacijana bacilot. Tvrdi te podlogi mo`at da bidat podlogi so jajca i podlogi so agar.

Podlogi so jajca

Prednosti :

- Lesno se pri premaat
- Najefitni se i ovozmo`uvaat dobra izolacijana mikobakteriite
- Mo`at da se ~uvaat vo fri`i der nekolku nedeli
- Retko se kontaminiraat zatoa { to so dr`at malahit zelena boja, i so koagulacijata se steriliziraat.

Nedostatoci

- Potrebno e dolgo vreme za izolacija - nekoga{ i 8 nedeli
- Koga }e nastane kontaminacijapodlogata cel osno se uni{tuva

Za pripremawena dobri podlogi va`no e :

- Neophodno e da se koristat supstanci so dobar kvalitet (hemi{ki~isti)
- Sterilna staklarija i sve`o destilirana voda
- Potrebno e precizno pri dr`uvawe kon upatstvata za pripremawe
- Da se proveritemperaturata vo pe-kata

- Da se odr` uvaat asepti~ni uslovi vo tek na pripremaneto na podlogata
- Jajcata odnadvor treba vni matel no da se i s~i stat pred da se i skr{ at
- Gotovi te podlogi se ~uvaat vo fri` i der
- Se stava 20 ml vo { i { enca i i 6-8 ml vo sekoja epruveta

7.1 Leven{ ajn - Jensenova podloga

Ovaa podloga e naj~esto kori stena podloga za izolacija na tuberkulozni otbaci, osobeno nejzidata modifikacija napravena po preporaka na Me|unarodnata Unija za Tuberkuloza i Belodrobni Zaboluvawa (IUALTD)

Reagensi :

Rastvor na mineralni soli :

Kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄)	2,4g
Magnezium sulfat (MgSO₄·7H₂O)	0,24g
Magnezium citrat	0,6g
Asparagin	3,6g
Glicerol	12 g
Destilirana voda	600 ml

Po rastvaraweto na solite, rastvorot se sterilizira na 121°C

Seladina sobna temperatura i se ~uva vo fri` i der

Rastvor na malahitno zeleno 2%

Malahit zeleno vo prav	2 g
Sterilna destilirana voda	100 ml

Se rastvara na denot na upotrebata, a dokolku stoi se talo` i ja gubi bojata

Homogenizirani celijajca

Sve` i jajca, ne postari od 7 dena, se ~i stat so temelno triewe so ~etka, toplavoda i alkalensapun. Sesu{ at i se prebri{ uvaat so 70% etanol. Sekr{ at so sterileno` i se matat vo sterilni uslovi.

Pripremanacelata podloga

Slednite sostojki se stavaat vo golema sterilna ~a{ a i dobro se me{ aat:

Rastvor na mineralni soli	600 ml
Rastvor na malahit zeleno	20 ml

Homogenizirani jajca (20-25 zavino od goleminata) 1000 ml

Se razleva po 10 ml vo bakteriolo{ki epruveti, tie se zatvara so metalno kape so navoj i vedna{ se stavaat da koaguliraat vo pe~ka.

Koagulacija na podlogata

Pred da se stavat podlogite vo pe-ka najdobro e taa da se zagree na 80°C. Podlogite se stavaat vo zakosena poloba i se ostavaat na 80-85°C, 45minuti. Po zavr{ enata postapka podlogata treba da e koagulirana, da ja zadr{i bojata i da nema meur-iwa.

Kontrola na sterilnost

Nekolku epruveti so gotovi podlogi se stavaat na 35-37°C i se inkubiraat 24-asa. Dokolku se sterilni }e ostanat nepromeneti.

^uvawe na podlogite:

Podlogite se ~uvaat vo fri`ider, dobro zatvoreni so nazna-en datum na praveweto. Mo`at da se ~uvaat najmnogu do 4 nedeli. Za izolacija na **M.bovis** vo podlogata ne se stava glacerol, a se dodava 8g natriumpiruvat vo solite.

8. ZASADUVAWE I INKUBACIJA

Zasaduvawe

So stoewe na dnoto na epruvetata so podloga se kondenzira odredena koli~ina na te-nost. Pred da se izvr{i zasaduvaweto taate-nost treba da se odstrani.

Najdobro e zasaduvaweto na materijalot da se izvr{i so pasterovapi-peta za ednokratna upotreba, i pri toa na povr{i nata od podlogata da se nanese 0,2-0,4 ml (2-4kapki) od centri-fugirani ot-sediment. Vo te-ni podlogi mo`e da se inokulira do 1 ml od primerokot.

Sekoj primerok treba da se zasadi na dve podlogi. Vo zemjite kade {to e pri-sutno zaboluvawe, pri~ineto od **M.bovis**, se prepоруva da se zasadi i edna podloga so dodaden piruvat.

Inkubacija kaj kulturnite

Kulturnite se inkubiraat na 35-37°C se dodekane se poka`evidli v rast, i dokolku vo tek na 8 nedeli ne poka`at rast, toga{ se tretiraat kako negativi.

Podlogite se postavuvaat vo zakosena poloba najmal ku 24-asa.

Ako vo inkubatorot nema dovolno prostor mo`at da se ~uvaat i spraveni, no dobro zatvoreni, za da se svede na minimum i sparuvaweto.

^itawena kulturnite

Tipi~ni tekolonii na **M.tuberculosis** se rapavi, nabrani, so voso-eni zgl ed, so kremboja, sporo rastat, vidli v ot rast se zabele`uva najrano po 3 nedeli. Dokolku kolonite koi porasnale se so somniteleni zgl ed, se prepоруva od kulturnite da se napravi preparat oboen po **Ziehl-Neelsen**. Preparatot se pravi so zemawe na mala koli~ina od kulturnata, so predmetna eza itaa se suspendira so triewe vo kapka fiziolo{ki rastvor na predmetno staklo. Razmaskata se ostava da se isu{i, se fiksira i se boi. **M.tuberculosis** se pojavuva na preparat od kulturna vo forma na pletenki nare-eni "corde

serpentinae, koi se javuvaat so razli~na dol`ina i debelina. Retko se prisutni i poedine~ni bakterii so dol`ina od 3-4 mikroni.

I dentifikacija (diferenciranje) na **M.tuberculosis**

Porasnanje kolonij na Leven{tajn - Jensenovata podloga treba da se diferenciraat so pomo{ na biohemi{ki testovi ili so genetski probi, za da mo`e so sigurnost da se doka`e deka se raboti za **M.tuberculosis**, a ne za nekoja druga bakterija od rodot **Mycobacterium**.

Za diferenciranje se koristat slednite biohemi{ki testovi:

- Niacin test
- Redukcija na nitrat
- Katalaza test
- Rast na podloga so R-nitrobenzoi~na kiselina
- Rast samo na temperaturi od 35-37°C
- Karakteristiki pigmentacija na kolonijate

9. EVI DENTI RAWE NA NAODOT I I ZVESTUVAWE

Site laboratorii za tuberkuloza koi pravat kulturi treba da imaat unificirani sistem za zabele`uvawe i izvestuvawe na rezultate.

- Kulturne notivostuvawe mo`e ponekoga{ da trae so meseci i zatoa e po`elno dodeka trae da se isprati izvestuvawe za tekot na postapkata.
- Ako vo tek na kultiviraweto se zabele`i deka podlogata se kontaminirala, potrebno e vedna{ da se dade izvestuvawe za da se isprati nov primerok.
- Rezultatobi~no se izdava za 6 ili 8 nedeli dokolku e negativen.
- Ako naodot e pozitiven se izdava i stepen na pozitivnost (broj na kolonij porasnanje na podlogata) po slednata {ema:

^itawe	I zvestuvawe
Nema rast	Negativna od
1 - 19 kolonij	Pozitivna od (vk.kolonij)
20 - 100kolonij	Pozitivna od (1+)

100-200kol oni i	Pozi ti ven naod (2+)
Skoro konfl uenten rast	Pozi ti ven naod (3+)
Konfl uenten rast	Pozi ti ven naod (4+)
Kontami naci ja	Kontami naci ja

Vo zemjite so visoka prevalenca na tuberkuloza pove}e od 85% od slu-ai te so tuberkuloza se dol`at na **M.tuberculosis**, dodeka zabol uvawa od ostanati te mi kobakteri i se dosta retki . Vo takvi slu-ai naodot mo`e da se dade samo vrz osnova na karakteri sti ki te na porasnati te kol oni i so slednata formul aci ja:

Na kul turata e dobi en _____ rast na mi kobakteri i so karakteri sti ki na **M.tuberculosis**.

Formul arot za i zvestuvawe na kul turel ni ot naod e daden vo dodatok br.4 Bi dej}i si te poedi nosti od kul turel noto i spi tuvawe ne mo`at da bi dat sodr`ani vo izvestuvaweto tie se zabele`uvaat vo registerot za kul turi .Vo laboratoriski ot registar treba da se sodr`ani slednite podatoci :

- Brzi na na rastot
- Brojot na porasnati kol oni i
- Karakteri sti ki na pigmentot
- Morfol ogi ja na kol oni i te
- Rezul tati od testovi te za i denti fi kaci ja

10.KONTROLA NA KVALI TETOT NA RABOTATA

Obezbeduvawe na kval itetot na rabotata vo laboratorii te vo koi se i zveduva kul turel no i spi tuvawe e sistem od akti vnosti koi i maat za cel da ja podobrat verodostojnosta i efi kasnosta na i spi tuvawata i da ja zgol emat negovata vrednost vo di jagnosti kata i sledeweto na bol ni te od tuberkuloza. Osnovni komponenti na ovi e akti vnosti se:

- Kontrol a na kval i tetot
- Podobruvawe na kval i tetot
- Ocena na stru-nosta

Ovie akti vnosti treba da utvrdat dali rezul tatot koj izleguva od laboratorija e precizen i verodostoen.

Kontrola na kvalitetot treba da se izveduva redovno i programot za nejzno izveduvawe treba da bi de praktičen i priliciv.

Za kontrola na kvalitetot na rabotata vo laboratorijata se odgovorni site vraboteni vo laboratorijata

Kontrola na kvalitetot se odnesuva na :

- Organizacijana laboratorijata
- Laboratorijska oprema
- Rakuvawe so primerocite
- Reagensi i medijumi
- Metodna kulturnost
- Izvestuvawe za rezultate

Klucni elementi za obezbeduvawe kvalitet se :

- Dobro obučen personal
- Racionalno rabotewe
- Postoewena dobra volja za izbegnuvawe i ispravuvawe na greškiteto vo rabotata
- Efikasna komunikacija

Merkiteto koi se prevzemaat za obezbeduvawe na kvalitetot vključuvat:

1. Merkiteto za pravilno organizirawe i vodewe na laboratorijata

- Site vrati vo laboratorijata treba da bidat postojano zatvoreni. Rasporedot na opremata i drugi materijali treba da bidet takov da obezbedi dobar tek na raboteweto. Rabotnite površini treba sekoj den da se dezinficiraaat so 5% fenol.
- Site laboratorijski ispituvawa treba da bidat zavedeni pravilno, taka kao što se izvedeni, izmenomeda se napravi samo so dozvolana odgovornost za laboratorijata i da se stavi datum.
- Celatadokumentacija zadolžitelno da se čuva dve godini.
- Laboratorijskemetodi koi se koristat mora da bidat potvrdeni, objaveni vo knigi, spisanija i priročniciza rabota.

2. Merkiteto za kontrola na opremata

- Opremata treba da odgovara na barawata i specifikacijata na proizvoditelot.
- Za celokupnata oprema treba da se čuvaat upatstvata za rabota i održuvawe.
- Datumi te i izveštaiteto od sekoeservisirawe isto taka treba da se čuvaat.
- Opremata treba redovno da se nadgleduva i da se obezbedi nejzno i spravno rabotewe.

3. Primeroci i formulari

- Se izveduvaat samo onie ispituvawa za koi postoi pismena barawe.

- Pismenoto barawe za laboratoriško ispituvawe (sprovođen list) treba da se -uva zasebno od primerokot za da ne dojde do negova kontaminacija. Ako toa se slu-i se avtoklaviraat i se baranov primerok.
- Baraweto za laboratoriški pregled treba da e celosno popolneto, a podatoci te na sputum kontejnerot treba da se soglasuvaat so isti tevo baraweto.
- Treba da se odredi kvalitetot na primerokot. Dokolku se utvrdi deka se raboti za saliva, treba da se notira, i pokraj negativni ot rezultat od ispituvaweto treba da stoi deka primerokot ne bi ladekvaten.
- Treba da se notira datumot na pristignuvaweto na primerokot kako i datumot na izvestuvaweto. Dokolku se kasni so izvestuvaweto toa treba da se obrazloži.

Reagensi i boi

- Rezervi na reagensi i boi ne treba da se -uvaat podolgo od {est meseci. Na sekoj od niv treba da se zapiše datumot na otvaraweto i dokolku kvalitetot ne e na zadovolitelno ni vo treba da se isfrli od upotreba.

Homogenizacija i dekontaminacija

- Sekoj mesec treba da se vodi evidencija za procentot na kontaminirani primeroci. Prifatliv procent e 2-5%. Kontaminacija pomala od 2% uka`uva na primena na premnogu jaka postapka za dekontaminacija, koja najverojatno uništava i gol em del od mikobakteri i te. Povi sok procent od 5% uka`uva deka postapkata za homogenizacija na sputumot ne e dobro napravena, bi deji nehomogenizirani ot sputum ne mo`e da se dekontaminira celosno.

6. Podlogi

- Sekoga se koristi sve`i jajca
- Temperaturata vo pe-kata za koagulacija treba postojano da se kontrolira. Podlogite so izmeneta boja i meur-i wa se isfrlaat od upotreba.
- Site podlogi se kontroliraat za sterilnost so inkubacija na 35-37°C vo tek na 24 -asa.
- Podlogite se -uvaat vo fri`ider, na temno, najdolgo -etri nedeli.

7. Kulturni rane

- Dase izbegne kontaminacija na podlogata, za sekoj primerok se koristi nova pipeta.
- Sekoga (koga posle silna pozitivna kultura) e se pojavi serija pozitivni kulturni so mal broj koloniji, treba da se posomnevame za kontaminacija.

8. Destilirana voda

- Atipični mikobakterii mnogu -esto mo`at da se javat kako kolonizatori na slavinite za voda, poradi toa tie treba redovno da se

proveruvaat. Ako se posomnevame deka e vodata zagadena, toga{ se zema pri merok od 200-250 ml voda, se centri fugi ra i sedi mentot se i spi tuva na di rektna mi kroskopi ja i kul tura.

PRI LOZI

- A. Obrazec za barawe za kul turel no i spi tuvawe
- B. Obrazec od kni ga za kul tura

11. Kori st ena l i t erarura

1. Jawetz, Melnick & Adelberg, s- *MEDICAL MICROBIOLOGY* (press 1991)
2. World Health Organization - *Laboratory services in tuberculosis control: Organization and management; Microscopy; Culture*
3. Gaby E. Pfyffer, Barbara A. Brown-Elliott, Richard J. Wallace – *Mycobacterium: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures* (Clinical microbiology -press 2003)
4. American Thoracic Society- *Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children*
5. B. Karaka{ evi } - *Medi ci nska mi krobi ol o gi ja so parazi t ol o gi ja*