

Mikrobiološka dijagnoza pneumokoknih invazivnih bolesti (IPB)

1. Uputstvo za uzorkovanje i transport uzoraka u laboratoriju

Streptococcus pneumoniae je alfa hemolitičan, Gram pozitivan diplokok. Nutritivni je izbirač, te su za izolaciju potrebne obogaćene hranljive podloge (kolumbija krvni agar, triptikaza soja krvni agar, moždano srčani krvni agar itd). Zahteva povećanu koncentraciju CO₂ (5%) tokom inkubacije, pa se podloge moraju inkubirati u termostatima sa CO₂. Osetljiv je na faktore spoljne sredine i autolizira u stacionarnoj fazi rasta, te je potreban adekvatan i brz transport bolesničkog uzorka u laboratoriju.

1.1. Uzimanje i transport materijala

U slučaju sumnje na IPB, neophodno je uzeti odgovarajući materijal, pravovremeno i na pravilan način, kako bi se bakterija mogla dokazati u uzorku. **Vrlo je važno da se materijal uzme pre započinjanja davanja antibiotika**, ili, ukoliko se tokom terapije uzorak ponovo uzima, pre davanja sledeće doze lekova, kada je koncentracija antibiotika u krvi najmanja. Transport materijala do laboratorije treba da je kratak (do 2 sata) i na odgovarajućoj temperaturi. Generalno, ukoliko se iz materijala želi izolacija pneumokoka, treba ga do obrade u laboratoriji držati na temperaturi 35-37°C, dok je za kraće vreme prihvatljiva i sobna temperatura od oko 25°C. Nikako se ne sme stavljati u frižider. Ukoliko se u bolesničkom uzorku dokazuje antigen ili nukleinska kiselina pneumokoka, materijal se može držati na +4°C.

1.2. Hemokultura

Ukoliko pacijent ima kliničke znake meningitisa, sepse, okultne bakterijemije, teške pneumonije i drugih IPB, neophodno je uzeti krv za hemokulturu.

Krv za hemokulturu se uzima venepunkcijom iz kubitalne vene. Zbog visokog rizika od kontaminacije, treba izbegavati uzimanje krvi iz centralnog veskog katetera.

Pre uzimanja krvi, treba imati pripremljene rukavice, iglu, špric, bočice za hemokulturu, dezinficijens, tufere vate. Ako se uzorak obrađuje u laboratoriji koje imaju automatizovane sisteme za detekciju porasta bakterija u krvi (BactAlert ili neki drugi sistem), krv se stavlja u bočice za hemokulturu odgovarajućeg proizvođača, dok laboratorije bez automatizovanog sistema koriste komercijalne podloge za kultivaciju aerobnih i anaerobnih bakterija, npr. „HEMOSAN-Torlak” ili neku drugu. Treba napomenuti da se po volumenu bujona razlikuju bočice za hemokulturu za odrasle i decu.

Ceo postupak se radi u rukavicama za jednokratnu upotrebu, koje se nakon uzimanja materijala, bacaju.



Slika 1. Bočice za hemokulturu za automatizovani sistem - bočice sa podlogama za anaerobne bakterije, aerobne bakterije i za pedijatrijsku populaciju

1. krv za hemokulturu treba uzimati 2 do 3 puta na dan, u razmacima od 1 – 2 sata
2. krv se uzima u dve bočice (za aerobne i anaerobne bakterije)
 - krv se inokuliše u tečnu hranljivu podlogu u bočicama za hemokulturu, odmah po uzimanju, odnosno pored bolesničke postelje
3. obeleži se bočica sa bujonom za hemokulturu
4. dezinfekcija bočice za uzimanje krvi - namočiti komadić vate 70% izopropilnim alkoholom i ostaviti ga na gumenom čepu bočice da stoji 1 min
5. dezinfikovati kožu gde će se raditi venepunkcija 70% alkoholom, a zatim povidon jodidom, tinkturom joda (100 ml 70% izopropil alkohola sa 1g joda) ili 2% rastvorom hlorheksidina u 70% alkoholu; ostaviti da deluje oko 30 sec, tj. pričekati da se jod ili hlorheksidin osuši; venu više ne palpirati na dezinficiranom mestu
6. uzeti krv i inokulirati u bočicu za hemokulturu
7. nakon venepunkcije, jod sa kože očistiti alkoholom
8. količina krvi koja se uzima:
9. od male dece se uzima 1 – 2 ml krvi, koja se razređuje u 20 ml bujona (1:10 do 1:20) od odraslih se uzima 5 – 10 ml krvi, koja se razređuje u 40 - 50 ml bujona (1:5 do 1:10) ako se koriste bočice za automatizovane sisteme, odnosno 10 - 20 ml ako se koriste komercijalne bočice koje imaju veću zapreminu bujona
10. na uputu za laboratoriju napisati podatke o pacijentu: JMBG, broj zdravstvene knjižice, naznačiti vreme uzimanja krvi i mesto (npr. iz centralnog venskog katetera – CVK ili periferne vene); naznačiti da li je pacijent na antibiotskoj terapiji i, ako jeste, na kojoj; napisati uputnu dijagnozu.

Transport uzorka

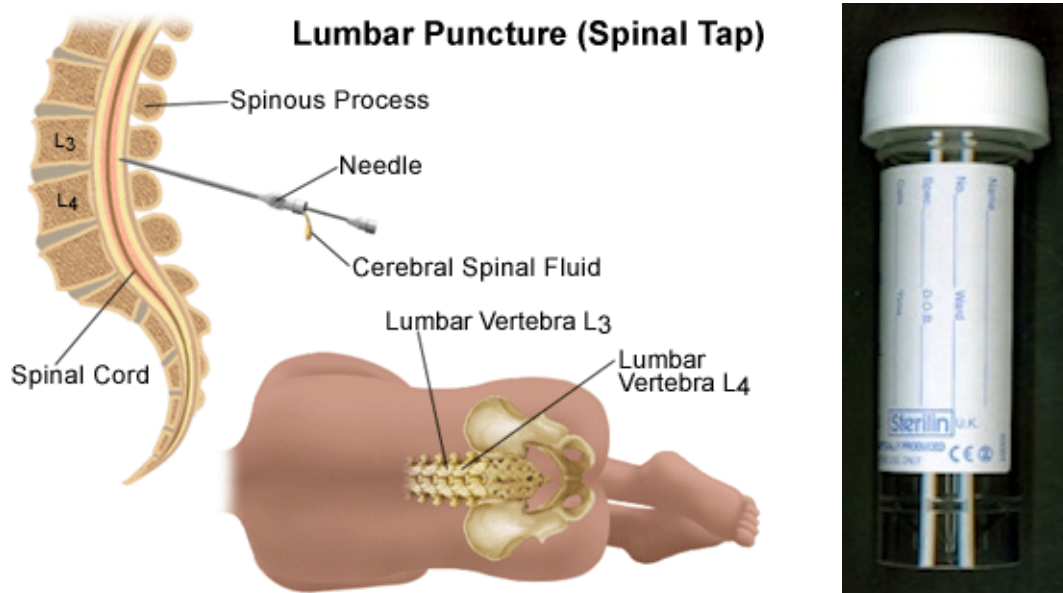
Najbolje bi bilo bočicu sa uzetom krvi odmah transportovati u laboratoriju. U ustanovama gde postoje automatizovani sistemi za hemokulturu, bilo bi poželjno da postoji 24 časovna mogućnost ubacivanja bočica sa uzorkom u aparat. Ukoliko nije moguće bočice dostaviti odmah u laboratoriju, optimalno bi bilo da se donesu u roku od 2 do 4 sata od uzimanja, a najkasnije 12 – 18

sati, ali jedino ukoliko se čuvaju na odgovarajućoj temperaturi. **Bočice za hemokulturu nikako ne stavljati u frižider.** Najbolje bi bilo da se drže na 35°C ili, eventualno, sobnoj temperaturi (25°C), a nikako na ekstremnim temperaturama (<18°C ili >37°C), koji deluju pogubno na većinu bakterija u krvi.

1.3. Cerebrospinalna tečnost (likvor)

Pri sumnji na meningitis se uzima likvor, lumbalnom punkcijom. Za to je potrebno imati dezinficijens za kožu, sterilnu gazu, vatu, odgovarajuće igle za odrasle, odnosno decu, epruvete koje se dobro zatvaraju ili gotove hranljive podloge u koje se likvor inokuliše odmah pored postelje pacijenta. Mogu se koristiti i bočice sa bujonom za hemokulturu (sa manjim sadržajem bujona).

1. koža se dezinfikuje 70% alkoholom, a zatim povidon jodidom, tinkturom joda (100 ml 70% izopropil alkohola sa 1g joda) ili 2% rastvorom hlorkeksidina u 70% alkoholu; sačekati da dezinficijens deluje 30 sec i da se dezinfikovano mesto osuši
2. ako je moguće, uzima se 3-4 ml likvora, a minimalno 1 ml kod odraslih. Kod male dece često se ne može uzeti više od 1 ml likvora.
3. likvor se uzima u tri posude za tri vrste analiza: mikrobiološku, citološku i biohemijsku. Ukoliko je moguće uzeti samo 1 ml, koristi se samo za mikrobiološku analizu
4. likvor treba dostaviti u laboratoriju što pre, optimalno u roku od 1 sata od uzimanja. Ne sme se stavljati u frižider, niti izlagati temperaturi višoj od 37°C, kao ni sunčevoj svetlosti. Može se držati u ruci, tj. na temperaturi tela dok se nosi do laboratorije. U slučaju da se ne može transportovati u roku od 1 sata, treba ga stavljati u transportne podloge za likvor. Alternativa su bočice za hemokulturu.



Slika 2. Lumbalna punkcija

1.4. Tečnosti iz primarno sterilnih regija (pleuralna, perikardijalna, peritonealna tečnost, sinovijalna tečnost, sadržaj apscesa, bioptati...)

1. koža se dezinfikuje 2% jodnom tinkturom (rastvor joda u 70% alkoholu ili 2% rastvorom hloroksidina u 70% alkoholu)
2. uzorak uzeti perkutanom aspiracijom pomoću igle ili hirurški
3. optimalna količina uzorka za izolaciju bakterija je 1ml
4. dobijena tečnost se stavlja u sterilnu posudu s čepom i navojem
5. označiti na uputu podatke o pacijentu, uputnu dijagnozu, vrstu materijala, koja se analiza traži i eventualno terapiju antibioticima
6. uzorak ne stavljati u frižider, već odmah doneti u laboratoriju; držati ga do 2 sata na temperaturi u opsegu 25 do 35°C

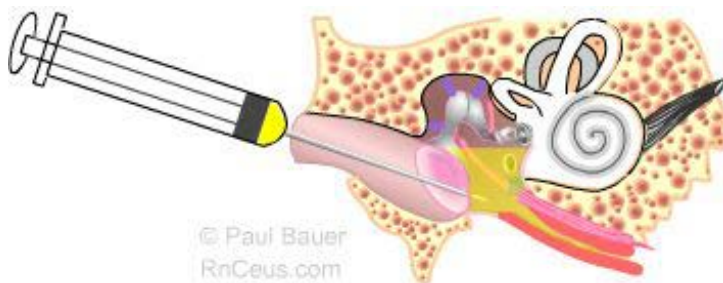
1.5. Aspirat srednjeg uha (ovo nije primarno sterilni materijal, ali je klinički važan)

Pri sumnji na bakterijsko zapaljenje srednjeg uha, materijal se uzima timpanocintezom, eventualno paracentezom. Kod timpanocenteze se iglom, koja prolazi kroz bubnu opnu, aspirira sadržaj srednjeg uha (slika 4), dok paracenteza podrazumeva inciziju bubne opne, pri čemu dolazi do pražnjenja sadržaja u srednje uho (slika 3).

1. pre timpanocenteze/paracenteze, spoljašnji slušni kanal tretirati 70 % etil alkoholom i osušiti sterilnim tupferom
2. uneti sterilan levak u spoljašnji slušni kanal, kroz koji se vrši incizija timpanične membrane. Purulentan iscedak uzorkovati odmah koristeći transportni sistem sa brisom (transportni medijum).
3. prema uputstvu za upotrebu, bris uneti u epruvetu sa transportnim medijumom, polomiti štapić brisa do obeleženog mesta i zatvoriti epruvetu poklopcem. Bris treba odneti što pre u laboratoriju i ne ostavljati ga u frižider.



Slika 3. Paracenteza



Slika 4. Tipanocenteza

2. Obrada uzoraka u laboratoriji

2.1. Hemokultura

Bočice za hemokulturu sadrže obično triptokaza soja bujon ili neku drugu obogaćenu tečnu hranljivu podlogu (moždano srčani bujon) i inkubiraju se ili u automatizovanim sistemima do 5 dana ili u inkubatoru na 35-37°C do 7 dana. Automatizovani sistemi su osetljiviji i detektuju metaboličke produkte koji nastaju prilikom umnožavanja bakterija, te registruju porast bakterija ranije u odnosu na klasično kultivisanje. Ukoliko aparat detektuje pozitivnu hemokulturu, treba je izvaditi iz aparata i pristupiti daljoj obradi uzorka. Hemokulture koje se inkubiraju u termostatu treba posmatrati posle 14 do 17 sati inkubacije, zatim posle 48 sati i na kraju posle 7 dana. Ukoliko se uoči zamućenje ili liza eritrocita, treba ih uzeti u dalju obradu. Pre izdavanja negativnog rezultata, hemokulture treba subkultivisati.

Od pozitivnih hemokultura se pravi:

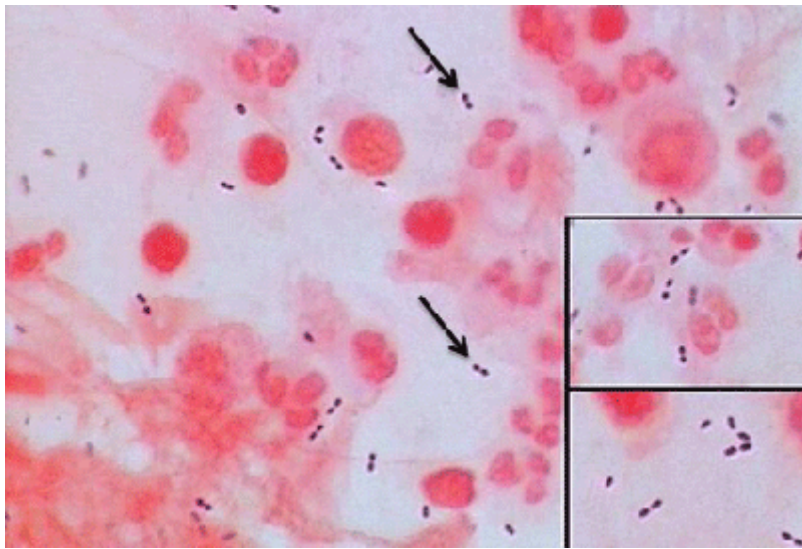
1. direktni preparat i boji po Gramu. Na direktnom preparatu se između ćelija krvi uočavaju Gram pozitivne diplokoke u slučaju pneumokoka, odnosno odgovarajući morfološki oblici ukoliko je sepsa drugog porekla.
2. subkultura na čvrstim hranljivim podlogama (čokoladni agar i krvni agar, sa 5% krvi) i kultiviše na 35-37°C i u prosustvu 5% CO₂, 18-24 sata. Od podloga se najčešće koriste kolumbija krvni agar i triptikaza krvni agar.

2.2 Cerebrospinalna tečnost (likvor)

Postupak obrade likvora zavisi od količine materijala koji je stigao u laboratoriju.

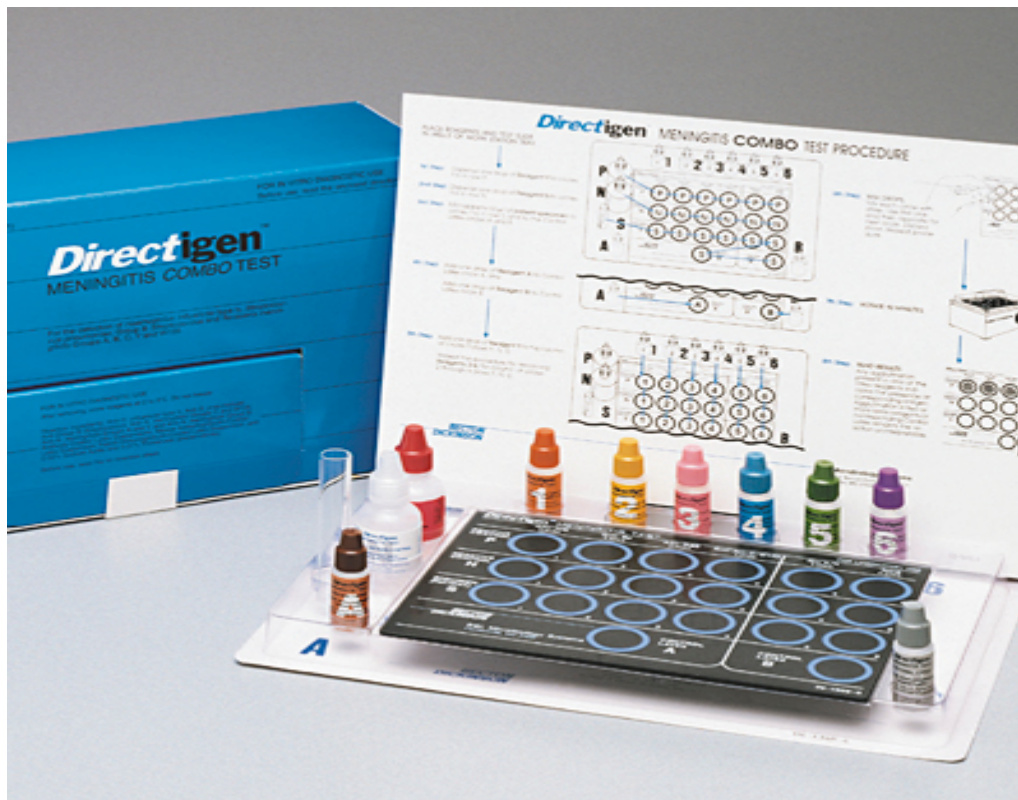
- ukoliko ima manje od 1 ml likvora, ne sme se centrifugirati, već se od njega pravi direktni preparat, radi test aglutinacije za meningealne patogene i kultiviše na hranljivim podlogama.
- ako ima više od 1 ml likvora, treba ga centrifugirati 10-15 minuta na 1000 x g. Odliti supernatant Pasterovom pipetom. Od supernatanta se može raditi test aglutinacije. Sediment snažno promućkati (vorteksirati) i uzeti jednu kap za pravljenje preparata koji se boji po Gramu i jednu kap za kultivisanje na podlogama.

Na preparatu, obojenom po Gramu, se, kod pneumokoknog meningitisa, uočavaju polimorfonuklearni leukociti i Gram pozitivne diplokoke (Slika). Direktni preparat ima veliku osetljivost i specifičnost, ali se ona znatno smanjuje ukoliko je pacijent dobio antibiotike pre uzimanja likvora.



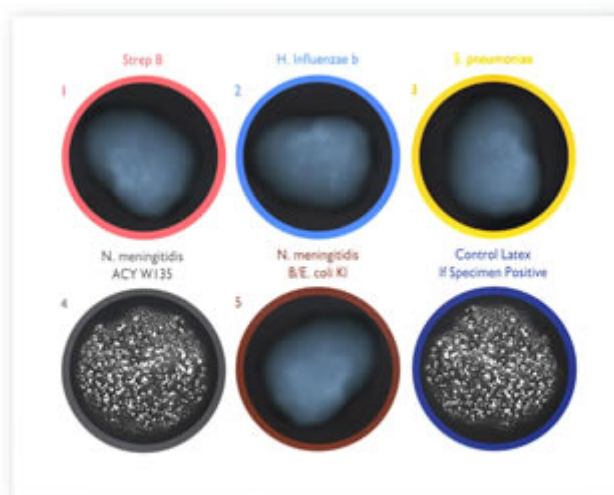
Slika 5. Izgled direktnog preparata likvora, pacijenta obolelog od pneumokoknog meningitisa. U preparatu se uočavaju polimorfonuklearni leukociti i Gram pozitivne diplokoke.

- za izradu testa lateks aglutinacije se koriste komercijalni kitovi. Na polistirenske lateks partikule su vezana antitela za bakterijske antigene, te posle reakcije sa njima, dolazi do aglutinacije. Obično se koriste skrining testovi za najčešće meningealne patogene: *S.pneumoniae*, *N.meningitidis*, *H.influenzae*, *S.agalactiae*, *E.coli* K1. neki od tih testova daju mogućnost i određivanja serogrupa, npr. tipa b *H.influenzae*, serogrupa A, B, C, Y i W135 meningokoka (Slika 6).



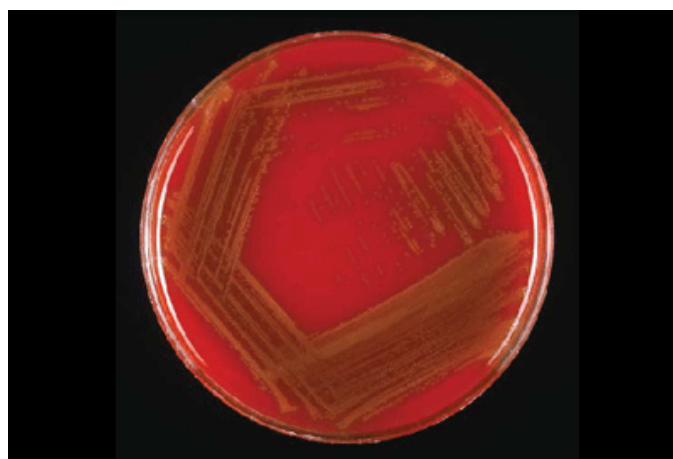
Slika 6. Test za direktno određivanje antigena meningealnih patogena u likvoru; neke testove je moguće koristiti i za određivanje patogena u urinu i serumu

Najbolje je da se koristi supernatant centrifugiranog likvora i da se test radi što pre posle stizanja materijala u laboratoriju. Ukoliko to nije moguće, supernatant se drži u frižideru (2°C do 8°C) nekoliko sati ili na -20°C tokom dužeg perioda. Voditi računa da se reagensi za lateks aglutinaciju stalno drže u frižideru i nikada ne zamrzavaju. Izrada lateks aglutinacije se radi prema uputstvu proizvođača. Kod najvećeg broja testova se supernatant zagreva u vodenom kupatilu na 100°C, 5 minuta; potom vorteksira. Na predmetno staklo ili plastificiranu karticu se stavlja jedna kap lateks suspenzije za svaki patogen i dodaje po 30-50 µl supernatanta i pločica se rotira 2 do 10 minuta (prema uputstvu). Pojava aglutinacije označava pozitivnu reakciju (slika 7).



Slika 7. Izgled pozitivnog testa lateks aglutinacije za *N.meningitidis*

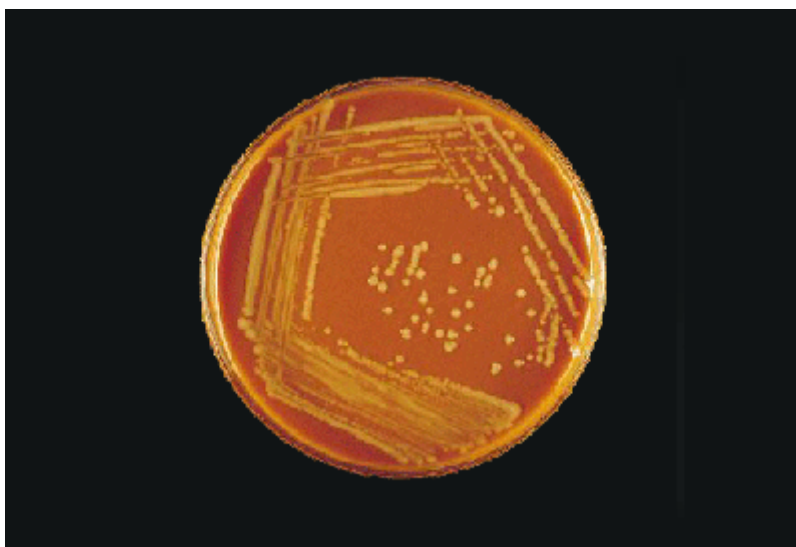
Sediment likvora se inokuliše na hranljive podloge – kolumbija krvni agar ili triptikaza soja krvni agar (5% krvi) i čokoladni agar. U podloge se dodaje ovčija ili konjska krv, nikako humana, zbog eventualnog prisustva antitela i drugih baktericidnih supstanci. Podloge se inkubiraju 18-24 sata na 35°C - 37°C, u prisustvu 5% CO₂. Kolonije pneukokoka se uočavaju posle 18 do 24 sata, najbolje na krvnom agaru. Da bi došlo do porasta kulture na podlogama, neophodno je što pre zasejati likvor, jer vijabilnost bakterija znatno opada vremenom. Na slikama 8, 9 i 10 je izgled kulture najčešćih meningealnih patogena.



Slika 8. Kultura *S.pneumoniae* na krvnom agaru



Slika 9. Kultura *N.meningitidis* na krvnom agaru



Slika 10. Kultura *H.influenzae* na čokoladnom agaru

- ukoliko je likvor odmah po uzimanju inokulisan u bočice za hemokulturu, one se stavljaju u automatizovani sistem i sa tim materijalom se postupa kao sa hemokulturama.

Pleuralna tečnost se inokuliše, bez prethodnog centrifugiranja, na triptikaza soja krvni agar i čokoladni agar. Podloge se inkubiraju 18-24 sata na 35°C - 37°C, u prisustvu 5% CO₂.

Aspirat zglobne tečnosti (sinovijalne tečnosti) se može:

1. direktno inokulisati u bočicu za hemokulturu i stavljati u automatizovani sistem i dalje obrađivati kao hemokultura
2. centrifugirati, a potom sediment inokulisati na obogaćene hranljive podloge (triptikaza krvni agar, kolumbija krvni agar) i inkubirati 18-24 sata na 35°C - 37°C, u prisustvu 5% CO₂.

Aspirat srednjeg uha se direktno zasejava na hranljive podloge (triptikaza krvni agar, kolumbija krvni agar) i inkubira 18-24 sata na 35°C - 37°C, u prisustvu 5% CO₂.

Slanje invazivnih sojeva pneumokoka u Nacionalnu referentnu laboratoriju (NRL) za streptokok

Po izolaciji invazivnog pneumokoka, potrebno je takav soj dostaviti u Nacionalnu referentnu laboratoriju (NRL) za streptokok, koja se nalazi na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, kako bi se obavila serotipizacija. Izolat je najbolje transportovati u transportnoj podlozi (Amies, slika 11. ili STGG - Skim-milk tryptone glucose glycerol), tako što se sveža prekoćna kultura pneumokoka na krvom agaru pokupi sterilnim brisom i inokuliše u transportni medijum (slika 12). Ovako konzervirana kultura može da stoji nekoliko sati na sobnoj temperaturi, ili 2 dana na temperaturi frižidera (+4°C). Podloga STGG može da stoji i više nedelja na -20°C.



Slika 11. Amies transportna gel podloga



Slika 12. Kolekcija bakterijske prekoćne kulture brisom iz pakovanja Amies transportne podloge i kasnija inokulacija brisa u transportnu podlogu

Soj se može dostavljati kao sveža kultura na krvnoj ploči, koja je oblepljena lepljivom trakom, kako se ploča ne bi otvorila i ne bi došlo do sušenja kulture. Ovo posebno važi za laboratorije u Beogradu ili laboratorije van Beograda, koje mogu kulturu da pošalju vozilom ili poštom.

Uz svaki izolat treba poslati i **popunjenu uputnicu**, koja sadrži osnovne podatke pacijentu i izolatu pneumokoka. Uputnicu možete preuzeti sa sajta www.nrlstrep.rs. Možete je odštampati i popuniti ručno i slati sa sojem ili popunjavati elektronski i poslati na neke od dve mejl adrese:

1. natasaopavski@gmail.com ili
2. ina.gajic@med.bg.ac.rs.