

Priprema uzoraka, izbor podloga, uslovi kultivisanja Izrada antimikograma

Gordana Sekešan, laboratorijski tehničar

Institut za mikrobiologiju i imunologiju
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

“DIJAGNOZA GLJIVIČNIH INFEKCIJA – OD UZORKA DO REZULTATA”

Edukacija za medicinske sestre i zdravstvene tehničare

Crowne Plaza BEOGRAD, 13.03.2015.

Prijem materijala

- svaki uzorak mora biti pravilno uzet, u dovoljnoj količini, u sterilnim uslovima i brzo dostavljen u laboratoriju
- ključno je pravilno obeležavanje uzoraka

Unos podataka

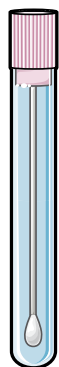
- obeležavaju se uzorak i uput, zavode se u protokol (papirna i elektronska baza)
- isti broj prati uzorak kroz sve dalje korake analize

A photograph of a laboratory form. At the top right, there is a barcode with the number 0 76950 45047 9 printed below it. The form contains various fields for data entry, including patient information, test results, and a section for the laboratory technician's signature and date.

Priprema uzoraka za analizu

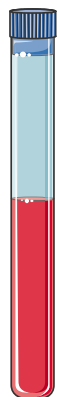


- uzorci uglavnom zahtevaju pripremu i obradu pre analize



Bris

*ne zahteva
posebnu obradu*



Krv

centrifugiranje,
odvajanje seruma



Nokat, koža, dlaka
usitniti sterilisanim
makazama



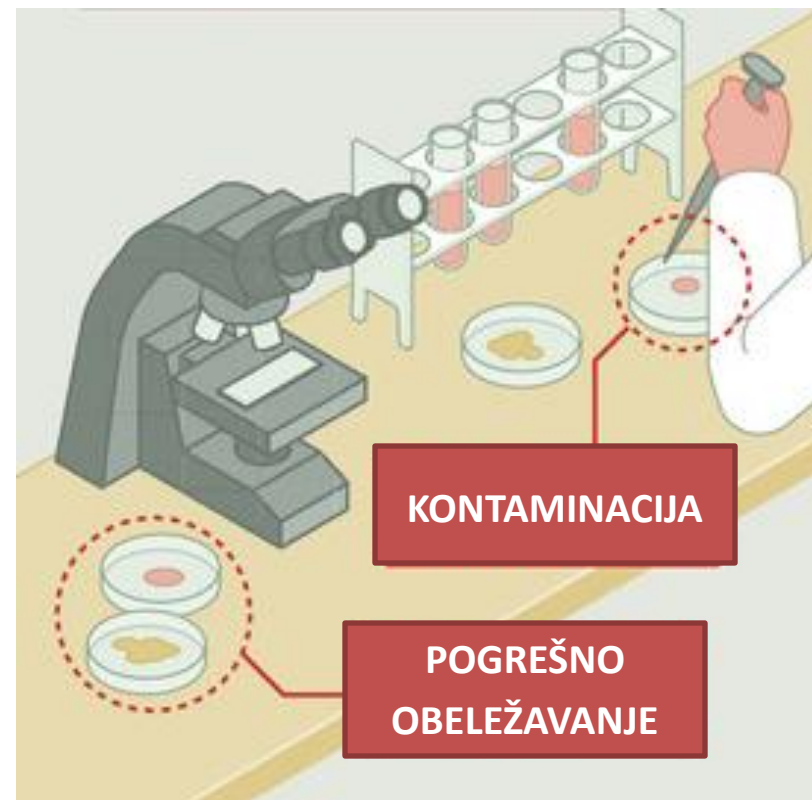
**BAL, sputum, urin,
likvor**
centrifugiranje, dalji
rad sa talogom



Tkivo
isitniti makazama i
tučkom

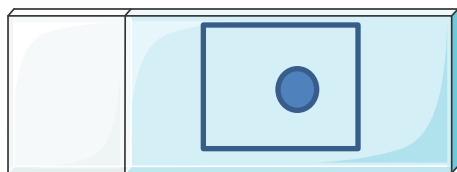
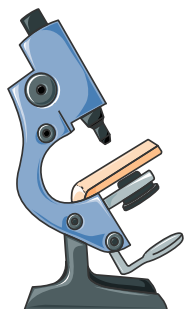
Priprema uzoraka za analizu-greške ❌

- Kontaminacija
- Zamena uzoraka
- Neadekvatna temperatura
- Nedovoljna obrada uzorka
- Manjak strpljenja



Klasične metode za detekciju gljiva

Direktni mikroskopski preparat (DMP)



30% KOH
Nigrozin / Tuš
Lactofenol cotton blue
Blankofor

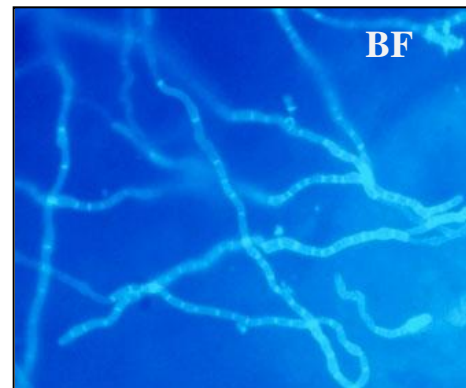
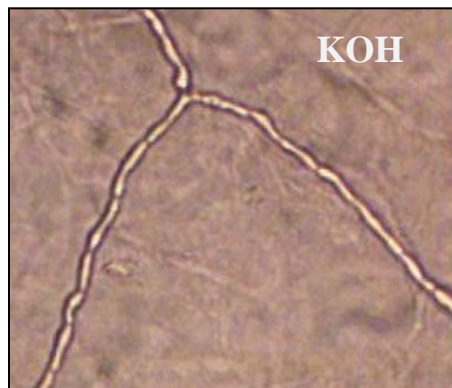
Kultivisanje na hranljivim podlogama



28°C / 37°C
1-21 dan

Mikroskopiranje

- preparati se prave od obrađenih uzoraka
 - **sediment** BAL, sputuma, urina, likvora,
 - **isitnjenih** kožnih derivata
- bolje je napraviti što više preparata
- koriste se svetlosni i fluorescentni mikroskop
- uveličanje 40x i 100x



Izbor hranljivih podloga

- izbor podloga i temperatura kultivacije zavise od vrste uzorka



**Sabouraud
dekstrozni
agar**

Univerzalna mikološka
podloga
svi uzorci



**Krompirov
dekstrozni
agar**

Za identifikaciju plesni
jer stimuliše
produkciju spora
(BAL, sputum, tkivo,
bris uha..)



**Dermatofit
selektivni
medijum**

Rast dermatofita
menja boju podloge u
crvenu
(nokat, dlaka, koža)



GACA

Cryptococcus
produkcija pigmenta
(likvor)



**Chrom
agar**

Identifikacija *Candida*
po boji kolonije

Izbor temperature kultivacije

Izbor temperature je u zavisnosti od uzorka, odnosno koju grupu gljiva očekujemo



Većina uzorka se inkubira u duplikatu na obe temperature jer očekujemo i kvasnice i plesni



Vaginalni bris, urin, likvor na 37°C jer očekujemo samo kvasnice



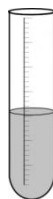
Uzorci kože, nokta, dlake pri sumnji na dermatofite na 28°C jer očekujemo samo plesni

Antimikogram

- Ako je rezultat kultivacije pozitivan, odnosno izolovane su gljive, radi se ispitivanje osetljivosti na komercijalne antimikotike
- Izbor antimikotika zavisi od vrste/porekla uzorka, kao i izolovane vrste gljiva
- Metode:
 - Disk difuzija
 - Dilucija
 - E-test

Antimikogram

STANDARDIZOVANA VELIČINA INOKULUMA GLJIVA
(0.5 McFarland ili $2-5 \times 10^6$ ćelija/spora gljiva po mililitru)

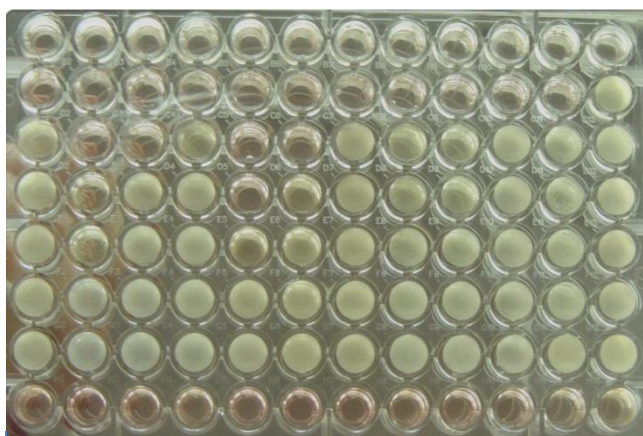


Disk difuzija



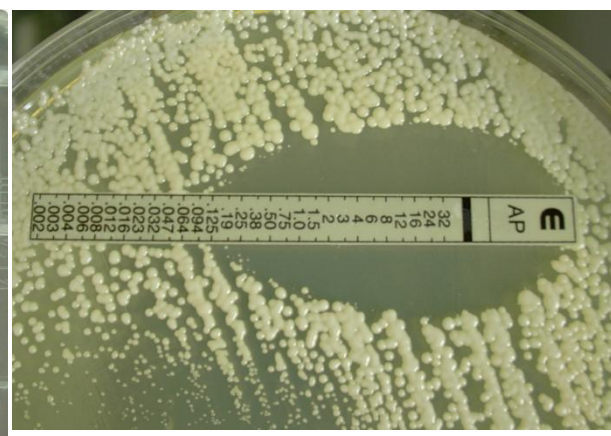
S
S-DD
I/R

Dilucija



MIK*
S
S-DD
I/R

E test



*Minimalna inhibitorna koncentracija

Komercijalni testovi

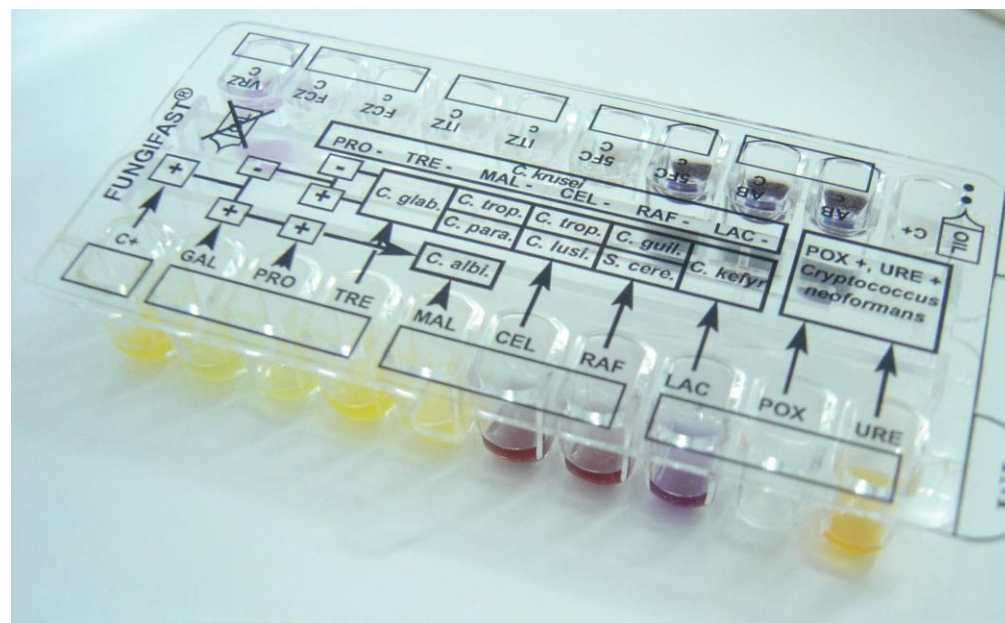
API

Identifikacija kvasnica



Fungifast

identifikacija i osetljivost kvasnica



Zaključak

- Za ispravan laboratorijski rad, potrebno je:
 - ispravno obeležiti uzorak
 - obraditi uzorak pre mikroskopiranja i kultivacije
 - odabrati odgovarajuće metode za analizu
- Stalno se unapređuju stare i razvijaju nove metode
 - ključna je kontinuirana edukacija zdravstvenih radnika