

GHIDUL NAȚIONAL PENTRU REȚEAUA LABORATOARELOR TB

2017

Dr Daniela Homorodean, medic primar microbiologie, doctor în științe medicale, coordonator al rețelei naționale a laboratoarelor de micobacteriologie, șef Laboratorul Național de Referință Cluj Napoca, Spitalul Clinic de Pneumoftiziologie Leon Daniello Cluj Napoca.

Dr Adriana Moisoiu, medic primar medicină de laborator, doctor în științe medicale, șef Laboratorul Național de Referință București, Institutul Național de Pneumoftiziologie Marius Nasta București.

Consultant tehnic din partea Organizației Mondiale a Sănătății - Emanuele Borroni, San Raffaele Scientific Institute, Milano

Cuprins

Lista tabelelor.....	4
Lista figurilor	4
Abrevieri	5
1. Recoltarea, păstrarea și transportul probelor la laborator	6
Recoltarea sputei expectorate spontan	7
Metode speciale de recoltare în caz de suspiciune de tuberculoză pulmonară	8
Recoltarea de produse biologice pentru diagnosticul tuberculozei extrapulmonare.....	9
Păstrarea probelor	10
Transportul la distanță a probelor de la pacienți sau al culturilor	11
2. Măsurile de biosiguranță și controlul infecțiilor	13
3. Recepționarea și înregistrarea probelor în laborator	19
4. Prelucrarea probelor pentru microscopie și cultură	21
Examenul microscopic.....	21
Cultivarea micobacteriilor	28
Interpretarea rezultatelor	30
Raportarea rezultatelor.....	31
Sisteme automate de cultivare în mediul lichid	33
Instrucțiune de lucru pentru folosirea sistemului automat MGIT 960 ¹	36
Instrucțiune de lucru pentru folosirea sistemului VersaTREK	40
Identificarea culturilor	49
Testul imunocromatografic pentru identificarea complexului <i>M.tuberculosis</i> în cultură	52
Antibiograma în sistem VersaTREK	61
5. Metode de biologie moleculară.....	67
Instrucțiune de lucru pentru GenoType ^{34,35}	68
GeneXpert MTB-Rif.....	78
Echipament și materiale	79
Controlul calității.....	81
Interpretarea rezultatelor GeneXpert MTB/RIF	82
6. Asigurarea calității	85
ANEXA. Prepararea reactivilor	86
Bibliografie	88

Lista tabelelor

Tabel I Verificarea ambalării corecte a materialelor din categoria B în vederea transportului	11
Tabel II. Protecția individuală a personalului din laboratorul de diagnostic al TB	15
Tabel III. Exprimarea semicantitativă a rezultatelor examenului microscopic și raportarea rezultatelor	25
Tabel IV. Evaluarea riscului examenului microscopic pentru evidențierea BAAR	26
Tabel V. Exprimarea semicantitativă a rezultatelor culturii pe mediul solid tip Lowenstein Jensen ...	31
Tabel VI. Riscuri de eroare la cultivarea în mediul solid Lowenstein Jensen	32
Tabel VII. Diagrama de lucru pentru testarea substanțelor anti-tuberculoase de linia întâi în sistem MGIT, din cultura pozitivă în mediul solid	57
Tabel VIII. Diagrama de lucru pentru testarea substanțelor anti-tuberculoase de linia întâi în sistem MGIT, din cultura pozitivă în sistem MGIT	59
Tabel IX. Diagrama de lucru pentru testarea pirazinamidei în sistem MGIT	60
Tabel X. Diluarea culturii pozitive pe MGIT între zilele 3-5 după pozitivare.....	61
Tabel XI. Diagrama de lucru pentru testarea substanțelor anti-tuberculoase de linia întâi în sistem VersaTREK, din cultura pozitivă pe mediul solid	62
Tabel XII. Dizolvarea substanțelor antiTB și concentrațiile rezultate	64
Tabel XIII. Adăugarea reactivilor și a substanțelor de inoculare la flacoanele de testare	65
Tabel XIV. Observații asupra testării și evaluarea testării.....	66
Tabel XV. Exemplu de rezultate pentru orientarea interpretării rezultatelor ABG VersaTREK.....	67
Tabel XVI. Cantitățile necesare pentru realizarea amestecului de nucleotide în funcție de numărul de probe de testat	70
Tabel XVII. Codul de culori al reactivilor	71
Tabel XVIII. Calcularea volumului de reactivi necesari în funcție de numărul probelor.....	72
Tabel XIX. Probleme care pot să apară și rezolvarea lor.....	77
Tabel XX. Valorile rangului Ct corespunzătoare rezultatelor MTB afișate	82

Lista figurilor

Figura 1. Algoritm de lucru pentru cultivarea în mediul lichid	35
Figura 2. Algoritm pentru sistemul GenoType	76
Figura 3. Algoritm pentru sistemul GeneXpert MTB-Rif	84

Abrevieri

ABG: antibiogramă
ADS: Apă Distilată Sterilă
Ag: antigen
AS: supliment antibiotic BAAR: bacili acido-alcool-rezistenți
CAP: Capreomicină
CC: controlul creșterii
CIC-M: control intern al calității pentru examenul microscopic
CPM: Cabinet de Protecție Microbiologică
EDTA: Etilen-Diamina Tetra-Acetică
EMB: Etambutol
ENC: Extraction Negative Control
FRC: forță relativă de centrifugare
GS: supliment de creștere IL: instrucțiune de lucru
INH: izoniazidă
LBS3: laborator cu nivel 3 de biosiguranță
LBS2: laborator cu nivel 2 de biosiguranță
LJ: mediul de cultură Lowenstein Jensen
LPA: (Line Probe Assay), metodă de hibridizare pe suport de nitroceluloză
MGIT: Mycobacterium Growth Indicator Tube
MOX: Moxifloxacină
MTB: *Mycobacterium tuberculosis*
NTM: micobacterii netuberculoase
OADC: Oleic acid, Albumină, Dextroză, Catalază
OFL: Ofloxacină
PANTA: Polymixin B, Amphotericin B, Nalidixic Acid, Trimethoprim, Azlocillin
PCR: (Polimerase Chain Reaction) reacție de polimerizare în lanț
PNPSCT: Programul Național de Prevenire, Supraveghere și Control al Tuberculozei
RIE: RMP, INH, EMB
RMP: rifampicină
RT-PCR: (Real Time PCR) reacție de polimerizare în lanț în timp real
SFS: Ser Fiziologic Steril
SIRE: SM, INH, RMP, EMB
TB: tuberculoză
TB-MDR: tuberculoză multidrog rezistentă
TDD: timp de detecție
UC: unități de creștere
UFC: unități formatoare de colonii
U.V.: ultra-violet
VT: VersaTREK
VTM: VersaTREK Myco
ZN: colorația Ziehl Neelsen

1. Recoltarea, păstrarea și transportul probelor la laborator

Se pot obține rezultate de laborator de calitate bună doar dacă probele de la pacienți sunt de calitate bună, recoltate de personal instruit, iar pacienții au fost instruiți asupra recoltării corecte. Probele trebuie să fie corect identificate și etichetate, păstrate și apoi transportate la laborator în condiții corespunzătoare^{1,2, 2b}.

Recoltarea sputei de la persoanele suspecte de tuberculoză (TB) se face înainte de începerea tratamentului specific antituberculos. În cazul terapiei intermitente din faza de continuare a tratamentului, când medicația anti-TB se administrează de 2 sau 3 ori pe săptămână, se va recolta sputa în dimineața dinaintea administrării medicației anti-tuberculoase^{3,4,55a}.

Se recoltează câte două eșantioane de spută de la pacienții suspecti de TB atât pentru diagnostic, cât și pentru monitorizarea tratamentului, la intervale de timp stabilite pentru fiecare categorie de bolnavi⁵. Pentru recoltare vor fi respectate recomandările din Ghidul metodologic de implementare a PNPSCT⁵, prezentate în continuare.

1. Recoltarea și mânguirea produselor patologice se fac astfel încât să fie evitată:

- contaminarea cu bacterii și fungi a produsului patologic;
- diseminarea germenilor în mediul ambiant;
- infectarea personalului medical implicat.

2. Recoltarea și mânguirea produselor patologice se face sub supravegherea unui cadru medical instruit pentru practicile referitoare la Controlul infecției, care trebuie să se asigure că produsul recoltat provine de la un pacient corect identificat și corespunde recomandărilor naționale și internaționale.

3. Respectarea *normelor generale de recoltare* și anume:

- în cazul persoanelor suspecte de TB, produsele se recoltează înainte de începerea tratamentului antituberculos.
- repetarea examenului bacteriologic în zile succesive. La suspecții de TB pulmonară, dacă primele două examinări au fost negative iar suspiciunea de TB se menține, se poate solicita recoltare și examinare pentru încă 2 eșantioane de spută (dar până la maxim 4 spute suplimentare).
- caracteristicile *recipientelor* pentru recoltarea sputei:
 - confecționate din material plastic, incasabil, transparent - pentru a putea aprecia cantitatea și calitatea produsului patologic fără a deschide recipientul;
 - cu deschidere largă (minim 35 mm diametru) - pentru evitarea contaminării pereților exteriori ai recipientului în timpul recoltării;
 - capacitate de 30-50 ml pentru spută și adaptată pentru fiecare tip de produs patologic;
 - cu capac cu filet care închide etanș recipientul;
 - cu posibilitatea de a fi marcate cu ușurință pe corpul recipientului.

Laboratorul poate să primească spre prelucrare pentru examen bacteriologic o varietate de produse biologice. Acestea se pot împărți în 2 categorii:

- Produse biologice polimicrobiene care conțin floră normală de colonizare (spută, urină, secreții din leziuni cutanate, sau produse care nu au fost recoltate aseptice).
- Material biologic steril, de obicei fără microorganisme de contaminare, provenit din colecții închise.

Factorii care pot influența viabilitatea micobacteriilor trebuie cunoscuți și evitați, indiferent de categoria de produs care va fi recoltat:

- administrarea de antibiotice cu efect antituberculos: rifampicină, streptomycină, kanamicină, amikacină, ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, claritromicină, amoxicilină + acid clavulanic, azitromicina, imipenem, clofazimina, tetraciclina, sulfonamide, minociclina.
- conservarea în formol sau recoltarea pe EDTA;
- contactul prelungit cu suc gastric (peste 3-4 ore);
- păstrarea probelor la căldură sau lumină;
- întârzierea prelucrării produselor patologice (peste 5 zile);
- congelarea prelevatelor.

Recoltarea sputei expectorate spontan

- se efectuează ori de câte ori se suspectează TB pulmonară;
- se efectuează în spațiu special amenajat, ”camera de recoltare”;
- se face după instruirea prealabilă a pacientului;
- se face sub supravegherea unui cadru medical (geam/vizor la camera de recoltare);
- se respectă măsurile de control al infecțiilor și condițiile optime de păstrare a produselor patologice: ventilație corespunzătoare (fereastră), lămpi U.V., măști, frigider pentru păstrarea probelor (până la maximum 4 zile), ușa cu geam pentru supravegherea recoltării.

Pacientul trebuie instruit cu privire la etapele recoltării, înainte de acestea:

- clătirea gurii cu apă pentru îndepărtarea resturilor alimentare și a bacteriilor contaminante;
- efectuarea a 2 inspirații profunde urmate de reținerea respirației după fiecare dintre ele timp de câteva secunde, apoi o a treia inspirație profundă, urmată de un expir forțat vor declanșa tusea care va ușura expectorația;
- depunerea sputei în recipientul/flaconul care se ține sub buza inferioară.
- spălarea mâinilor după recoltare

Cadrul mediu sau persoana instruită care asistă recoltarea:

- instruieste pacientul asupra modului de recoltare a sputei, deschiderea și închiderea flaconului;
- înmânează pacientului flacon etichetat cu numele acestuia, scris clar (pe corp, nu pe capac);
- dacă sputa recoltată este insuficientă cantitativ, pacientul trebuie încurajat să expectoreze din nou până la obținerea rezultatului dorit (la unii pacienți este nevoie de timp mai îndelungat pentru această manevră);
- dacă nu se obține o expectorație de calitate, ci salivă, recipientul folosit va fi considerat deșeu infecțios și trebuie îndepărtat ca atare;
- dacă s-a recoltat corect, asigurați-vă că recipientul este bine închis.
- spălați-vă mâinile cu apă și săpun;
- dați un alt recipient etichetat pacientului și asigurați-vă că acesta a înțeles că a doua zi va recolta un nou produs imediat după trezirea de dimineață (în caz de recoltare nesupravegheată, la domiciliu);
- arătați pacientului cum se închide etanș recipientul.
- se recoltează 2 probe pentru fiecare examinare bacteriologică, ambele sub supraveghere medicală sau una dintre ele emisă spontan în dimineața zilei următoare, după instruirea pacientului suspect de TB asupra recoltării corecte.^{6,7}

Sputa de bună calitate este: în cantitate de 3-5 ml, cu particule purulente; este frecvent vâscoasă și mucoidă; poate fi fluidă, dar să conțină fragmente de țesut necrozat; poate fi stratificată în culori de la alb mat la verde⁴.

Metode speciale de recoltare în caz de suspiciune de tuberculoză pulmonară

În cazul pacienților care nu expectorează, dar sunt suspecți de TB pulmonară activă se folosesc alte metode de recoltare:

- sputa indusă cu aerosoli expectoranți;
- lavajul laringo-traheal cu ser fiziologic steril (SFS);
- aspiratul gastric;
- aspiratul bronșic sau lavajul bronho-alveolar prin bronhoscopie.

Pe buletinul de solicitare se menționează metoda de recoltare/produsul biologic.

Sputa indusă

Inhalarea de aerosoli calzi salini-hipertoni (soluție de NaCl 5-10%) irită căile respiratorii și determină tuse cu expectorarea unui produs apos, cu aspect asemănător salivei, dar provenit din profunzimea arborelui bronșic.

Recoltarea:

- se începe cu o primă ședință de aerosoli cu durata de 10 minute;
- dacă nu este provocată tusea, se recomandă bolnavului să facă efort de tuse voluntară în următoarele 10 minute.
- în caz de insucces, se reia aerosolizarea cu durata de încă 10-20 minute sau se recurge la altă procedură de recoltare.

Lavajul laringo-traheal

- pacientul face gargară cu xilină 1%, repetat de 2 ori;
- cu o seringă cu canulă curbă, sub controlul oglinzii laringiene se introduc 5-10 ml ser fiziologic steril;
- tusea productivă apare în cursul manevrei sau după dispariția anesteziei;
- se recoltează proba, se verifică volumul și calitatea ei (aspect grunjos, turbure);
- se va recolta și sputa eliminată spontan în următoarele 24 ore.

Aspiratul bronșic și lavajul bronho-alveolar

Se efectuează numai în unitățile care au instrumentarul necesar (bronhoscop) și personal cu competență în acest domeniu. Produsul se recoltează direct în recipiente sterile, în timpul manevrei de lavaj, prin bronhoscop. Se va recolta și sputa eliminată spontan în următoarele 24 de ore.

Lavajul laringo-traheal (spălătura bronșică), lavajul bronho-alveolar și aspiratul bronșic au avantajul că ulterior acestora este posibil să se elimine spontan spută de bună calitate, care se colectează pentru examinare de laborator.

Lavajul gastric/aspiratul gastric este recomandat atunci când niciuna dintre metodele menționate anterior nu este posibilă, pentru următoarele categorii de pacienți suspecți de TB:

- pacienți necooperanți sau care își înghit sputa;
- pacienți care nu expectorează din cauza unor condiții coexistente: comă, boli neurologice etc.;
- copiii mici care nu știu să expectoreze.

Recoltarea se face dimineața la trezire, după repaus alimentar de 8-10 ore, înainte ca pacientul să mănânce, de către personal instruit pentru această procedură.

- se aspiră conținutul stomacului dimineața la trezirea din somn (aspirat gastric) cu sondă de unică folosință adaptată la seringă (sonda Nelaton la copii sau sonda Einhorn la adulți);
- dacă volumul de lichid recoltat este redus, se introduce pe sondă 5-10 ml SFS la copii, respectiv 20-30 ml la adulți;
- se aspiră conținutul gastric cu o seringă sterilă de 50 ml;
- lichidul aspirat se colectează în recipient steril, cu capac filetat, cu capacitate adecvată.

Proba trebuie prelucrată cât mai curînd după recoltare deoarece micobacteriile sunt distruse rapid datorită acidității gastrice. Dacă nu se poate prelucra în primele 4 ore, se ajustează pH-ul fluidului la valori neutre cu bicarbonat de sodiu sau fosfat disodic. Neutralizarea se face prin amestec în părți egale de aspirat gastric și fosfat disodic 15 % steril sau bicarbonat de sodiu 10%, steril, în prezența unui indicator de pH. Sensibilitatea metodei scade cu creșterea vârstei.

Combinarea inducerii sputei prin folosirea de aerosoli urmată în 30 de minute de lavaj/aspirat gastric crește procentul de culturi pozitive, comparativ cu utilizarea fiecăreia dintre cele două metode separat.^{5a}

Recoltarea de produse biologice pentru diagnosticul tuberculozei extrapulmonare

Colecțiile închise

Fluidele (cefalorahidian, pleural, pericardic, sinovial, ascitic, sânge), precum și alte produse (puroi, măduvă osoasă), sunt recoltate de către medic, utilizând tehnici de aspirație sau proceduri chirurgicale.

În majoritatea cazurilor de TB extrapulmonară numărul micobacteriilor din leziuni este mic, dar însămânțarea pe medii de cultură cu calități nutritive diferite poate crește șansa izolării acestora. Se folosesc mediul solid Lowenstein - Jensen și, în funcție de dotarea laboratorului, mediul lichid Middlebrook 7H9 în sistem automat de cultivare.

Dacă produsele patologice cu consistență lichidă nu pot fi însămânțate imediat pe medii de cultură, pentru a preveni formarea flocoanelor de fibrină, la 10 ml lichid biologic se va adăuga o picătură de citrat de sodiu 20% steril sau 0,2 mg/ml heparină². *Nu se va folosi EDTA*, care inhibă creșterea micobacteriilor.

Transportul la laborator trebuie făcut cât mai repede.

Dacă nu se poate asigura transportul imediat către laborator sau se întârzie prelucrarea, se vor păstra la frigider la 4-8⁰ C, dar nu se vor congela.

Hemocultura, măduva osoasă

Izolarea micobacteriilor din sânge sau măduvă osoasă, în mod particular la cazurile cu infecție HIV, la care șansa infecției diseminate cu micobacterii este mare, se face prin prelucrare specială, folosind sisteme de recoltare și cultivare dedicate. Este vorba de sistem de centrifugare –liză, în care se realizează liza celulelor sanguine, urmată de centrifugare și însămânțarea pe medii de cultură, preferabil lichide tip Middlebrook 7H9 (dar nu în sistem MGIT 960).

Fragmente tisulare (piese de biopsie)

Produsul recoltat trebuie pus după recoltare în recipient steril, fără soluție de fixare sau conservare. Pentru a preveni deshidratarea în cazul fragmentelor mici, se admite adăugarea unei cantități de 0,5 ml ser fiziologic steril, cu menținerea la temperatură sub $+10^{\circ}\text{C}$ ^{2,2b}.

Urina

Examinarea mai multor eșantioane (3-4) crește șansa izolării micobacteriilor.

Recoltarea urinei pentru suspiciunea de TB uro-genitală trebuie să fie precedată de:

- excluderea unei infecții urinare netuberculoase prin efectuarea de uroculturi pentru microbi cu creștere rapidă.
- cu 24-48 ore înaintea recoltării se recomandă regim hiposodat, reducerea cantității de lichide ingerate și suspendarea administrării de produse care acidifică urina și influențează viabilitatea MTB (vitamina C, aspirină, streptomycină, amikacină, kanamicină, chinolone, rifampicină, claritromicină, amoxicilină-clavulanat, imipenem).

Recoltarea urinei:

- se face toaleta riguroasă a organelor genitale externe prin spălare cu apă și săpun;
- se recoltează prima urină de dimineață, în 2-4 zile succesive;
- se aruncă primul jet de urină, apoi se colectează într-un recipient steril de 120 ml restul urinei eliminate;
- se transportă imediat la laborator pentru a fi prelucrat;
- dacă nu se poate prelucra imediat se admite păstrarea urinei la frigider ($+4 -8^{\circ}\text{C}$) cel mult 24 ore.

Păstrarea probelor

Dacă nu pot fi prelucrate imediat după recoltare, probele sunt păstrate la sediul recoltării (până la organizarea transportului la laborator) sau în laborator după recepționare și până la momentul prelucrării, în frigider special dedicat păstrării produselor biologice, la temperatura de $+4-8^{\circ}\text{C}$, pentru cel mult 3-4 zile de la recoltare, în tăvi sau cutii care pot fi ușor dezinfectate. Urina trebuie prelucrată cât mai curând posibil după recoltare, în aceeași zi.

Nu se folosesc nici un fel de substanțe cu rol de conservare a probelor păstrate în vederea expedierii pentru prelucrare. Pentru evitarea deshidratării pieselor mici de biopsie, acestea se pot umecta cu câteva picături de SFS.

Trimiterea probelor la laborator se face:

- împreună cu formularul de solicitare standardizat, ultima revizuire aprobată în uz (anexa 8 din Ghidul metodologic de implementare a PNPSCT ⁵ sau revizia comunicată ulterior), completat la toate rubricile;
- un singur formular pentru toate probele, cu date de identificare identice pe recipient și pe formular.
- etichetarea flacoanelor cu numele și prenumele bolnavului pe corpul recipientului, nu pe capacul acestuia.
- de către persoana desemnată, instruită, în cutii speciale din plastic, prevăzute cu compartimente pentru separarea și fixarea flacoanelor cu spută sau alte produse.
- transportul probelor către laborator trebuie realizat imediat după recoltare sau, dacă nu este posibil, acestea se păstrează la frigider (la $+4-8^{\circ}\text{C}$ maxim 3-4 zile (pentru a minimaliza multiplicarea florei de asociație). Face excepție urina, care trebuie recoltată și prelucrată în aceeași zi.

Transportul la distanță a probelor de la pacienți sau al culturilor

Produsele recoltate de la pacienți și culturile de *M. tuberculosis* destinate testării pentru sensibilitate se încadrează în categoria B de marfă din punctul de vedere al riscului pe care îl reprezintă, fiind necesară ambalarea în sistem triplu stratificat⁸.

La pregătirea unui transport de material categoria B este necesar să fie verificate etapele menționate în tabelul I.⁸

Tabel I Verificarea ambalării corecte a materialelor din categoria B în vederea transportului

Verifică	Activitate
1	Recipientul PRIMAR, care CONȚINE PROBA (sputa, cultura etc.) este bine închis cu capac filetat
2	Fiecare capac este înfășurat cu bandă adezivă
3	Fiecare flacon este numerotat cu numărul complet din tabelul însoțitor
4	Pentru probele lichide, recipientul este incasabil și conține maxim 500 ml.
5	Pentru probele solide (ex. cu mediu de cultură solid) recipientele primare să fie rezistente, să conțină maxim 500g
6	Recipientele primare să fie învelite individual sau separat și plasate în RECIPIENTUL SECUNDAR. Acesta trebuie să fie complet închis, să nu permită scurgerea în caz de spargere accidentală sau prelingere din recipientul primar.
7	Recipientul secundar să fie certificat de producător înainte de folosire.
8	Materialul absorbant a fost plasat între recipientele primar și secundar în cantitate suficientă ca să poată absorbi tot conținutul tuturor recipientelor primare.
9	Recipientul secundar nu este prea plin (poate fi introdus un creion între recipientele primare după introducerea materialului absorbant).
10	Între ambalajul secundar și terțiar se plasează acumulatorul rece furnizat odată cu cutia.
11	Este inclusă o listă cu conținutul pentru fiecare transport. Lista (tabel) să includă și nr. de telefon, fax, adresa de e-mail a expeditorului și destinatarului
12	AMBALAJUL EXTERIOR, care conține ambalajul primar și secundar să fie robust, incasabil, rezistent, cu dimensiuni adecvate conținutului.
13	Ambalajul exterior nu trebuie să fie mai mare de 4 litri pentru transportul de lichide.
14	În cazul probelor solide, ambalajul extern să nu fie mai mare decât pentru un total de 4 kg, iar fiecare din recipientele primare să nu conțină mai mult de 500 g.
15	Pachetele se plasează în pungile de plastic oferite de transportator.
16	Se vor folosi doar ambalaje autorizate, care au inscripționată categoria B de material biologic și marca UN 3373. Nu mai este necesară adăugarea pictogramei de pericol biologic.
17	În afara ambalajului terțiar se plasează punga/plicul cu documentele însoțitoare.

Notă: Pentru situațiile în care este necesar transportul internațional, acesta se face pe cale aeriană și se consideră ca material infecțios de categorie A (UN2814), recipientul primar și

secundar trebuie să reziste fără spargere, la o diferență de presiune internă de până la 95kPa (14psi), la temperaturi de la -40°C la 55°C (-40°F la 130°F).

Sistemul de bază al ambalajului triplu

Se utilizează pentru toate substanțele infecțioase și se compune din trei straturi, astfel:

- *Recipientul primar.* Conține proba învelită într-o cantitate suficientă de material absorbant care ar putea absorbi întreaga cantitate de lichid în caz de spargere.
- *Ambalajul secundar.* Rezistent la șocuri mecanice și înțepare, etanș, care conține și protejează recipientul (ele) primar(e). Mai multe recipiente primare protejate cu material de amortizare pot fi plasate într-un singur ambalaj secundar, cu suficient material suplimentar absorbant pentru a absorbi întreaga cantitate de lichid în caz de spargere.
- *Ambalajul exterior.* Ambalajele secundare sunt introduse în ambalaje exterioare de transport, protejate cu material adecvat de amortizare. Ambalajele exterioare protejează conținutul lor de influențele externe, respectiv deteriorarea fizică în timpul transportului și trebuie să fie rigid. Cel puțin una dintre suprafețele exterioare trebuie să aibă dimensiunea de minim 10x10 cm.

Pe ambalajul exterior trebuie să fie scrise clar numele și adresa completă a destinatarului și expeditorului, inclusiv numerele de telefon. Trebuie să fie menționat faptul că are în interior material infecțios din categoria B^{9,10,11,12}.

Refolosirea ambalajelor și expedierea ambalajelor goale

Ambalajele de transport pot fi refolosite numai după ce au fost dezinfectate corespunzător. Înainte de reutilizarea ambalajului, expeditorul trebuie să se asigure că toate marcajele și etichetele indică substanțele care sunt expediate în acel transport.

Dacă expeditorul trimite un colet gol, acesta trebuie să fie dezinfectat/sterilizat în prealabil, iar toate marcajele și etichetele care nu mai sunt necesare trebuie să fie îndepărtate sau acoperite.

Transportul trebuie să fie planificat, destinatarul fiind înștiințat despre intenția de expediere a coletului, iar destinatarul trebuie să confirme primirea lui.

La recepția probelor în laborator acestea sunt verificate.

Nu vor fi prelucrate și vor fi raportate ca *neconformități* care se comunică imediat medicului solicitant, următoarele situații^{2,2b}:

- Prezintă recipiente sparte sau fisurate, sau din care s-a scurs prelevatul clinic.
- Recipientul este neetichetat sau datele de pe eticheta prelevatului nu corespund cu datele de pe buletinul de cerere de analiză.
- Recipientul cu prelevat clinic nu este însoțit de buletin cu cererea de analiză.
- Prelevatul clinic a fost recoltat într-un recipient neconform (tub de medicamente, tub destinat recoltării sângelui etc.).
- Prelevatul clinic a fost recoltat pe formalină sau EDTA.
- Cantitatea de prelevat clinic este mult prea mică pentru efectuarea analizelor solicitate sau este uscat.
- Nu este corespondență între prelevatul clinic trimis și prelevatul menționat în foaia de cerere de analiză.
- Timpul scurs de la recoltarea sputei până la predarea la laborator este mai mare de 4 zile.

- Timpul scurs de la recoltarea urinei până la predarea la laborator este mai mare de 1 zi.
- Vor fi respinse de la prelucrare doar sputele intens sanghinolente deoarece există șanse mici de a obține un rezultat de calitate.

Criterii de acceptare a produselor pentru prelucrare^{2,2b}

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Spută în cantitate de 3-5 ml, cu aspect purulent sau muco-purulent • Produs recoltat în recipient adecvat produsului recoltat, fără conservanți • Recipient corect etichetat • Transportul s-a realizat în condiții care nu au afectat proba • Formularul de însoțire este corect completat |
|---|

Se acceptă spre prelucrare proba, dar este necesară menționarea situației particulare pe formularul de solicitare^{2b}:

- Spută cu striuri discrete de sânge - consemnată pe formular
- Spută în cantitate mai mică de 2 ml, dar cu aspect purulent - menționare pe formular
- Aspect apos al produsului trimis ca spută, fără particule în suspensie - când se scie pe formularul de solicitare aceasta și se solicită un eșantion corespunzător de spută sau recoltarea prin altă metodă.
- Piese de biopsie recoltate pe formalină pot fi folosite doar pentru metodele de biologie moleculară^{2a}
- LCR în cantitate mai mică de 2 ml

2. Măsurile de biosiguranță și controlul infecțiilor

M. tuberculosis este inclus în grupa III de risc, care cuprinde microorganisme asociate căii aeriene de pătrundere în organism. Controlul infecției în laborator presupune ansamblul măsurilor de reducere a producerii și răspândirii aerosolilor și particulelor infecțioase (1-5 μm diametru), cu prevenirea inhalării în timpul activității profesionale².

Măsurile pentru controlul infecției se pot grupa în:

- Administrative: reguli, reglementări și practici pentru reducerea riscului de expunere la infecție;
- Ecologice (sau ingineresti): reducerea concentrației aerosolilor infecțioși prin ventilație naturală sau artificială, filtrare, iradiere;
- Protecția personală folosind echipament adecvat;
- Evaluarea riscului și instruirea personalului.

Fiecare unitate sanitară trebuie să aibă reguli pentru controlul infecției în conformitate cu reglementările naționale, iar acestea să fie cunoscute de către toți angajații.

La recoltarea probelor de la pacient este necesar să fie asigurate șanse maxime ca acestea să fie de bună calitate, dar în același timp să fie redus la minim riscul contaminării mediului ambiant sau al persoanelor care asistă la recoltare. Nu este acceptată recoltarea sputei în laborator⁶.

Camerele/ boxele de recoltare trebuie să fie prevăzute cu sistem de exhaustare/aerisire, lampă UV, chiuvetă cu apă curentă, fereastră pentru observarea recoltării din exterior.

Pe tot traseul probelor recoltate de la pacienți până la laborator, iar aici pe toată durata prelucrării lor până la eliminarea ca deșeu inactivat, fiecare persoană trebuie să respecte normele de protecție colectivă și individuală pentru prevenirea infecției.

Când se mănuieste material infecțios este obligatorie folosirea echipamentului de protecție individuală (halat cu mâneci lungi, mănuși, mască cu filtru HEPA- FFP2 cu supapă, capelină).

Probele care conțin sau ar putea conține micobacterii se mănuiesc exclusiv în cabinet de protecție microbiologică (CPM) de clasă II sau I². Se include aici și deschiderea coletelor cu probe primite din alt laborator/spital. Nu este permis lucrul cu material potențial infecțios la masă.

Infectarea cu micobacterii se poate produce pe cale aeriană, digestivă sau cutanată¹³. Cunoscând căile posibile de infectare, personalul se poate proteja prin folosirea corectă a echipamentului adecvat de protecție individuală, prezentat în tabelul II^{2b}.

Infectarea pe cale aeriană în laborator are loc atunci când se produc aerosoli infecțioși iar personalul nu are protecție respiratorie adecvată. Următoarele activități sunt generatoare de aerosoli infecțioși:

- deschiderea bruscă a recipientelor cu produs patologic sau/și deschiderea lor imediat după agitare sau scoaterea din centrifugă;
- etalarea produsului pe lamă (prin strivire între 2 lame, cu pipeta sau cu ansa bacteriologică);
- însămânțarea cu pipeta a produsului patologic dar mai ales a suspensiei bacteriene apoase pentru antibiogramă, inclusiv realizarea diluțiilor pentru aceasta;
- pipetarea eșantionului extras pentru identificarea micobacteriilor;
- descărcarea flacoanelor / supernatantului în recipientul pentru colectare și autoclavare;
- lucrul cu produs infecțios în fața ferestrei deschise;
- centrifugarea, dar mai ales deschiderea centrifugii imediat după spargerea unui tub în interiorul centrifugii care nu are protecție anti-aerosoli;
- extragerea acului seringii din dopul de cauciuc al flacoanelor de cultură în mediul lichid;
- spargerea/vărsarea unui recipient cu suspensie micobacteriană apoasă;
- recoltarea sputei în laborator;

Infectarea pe cale digestivă (prin înghițire)

- pipetarea cu gura a suspensiei bacteriene;
- ingestia de alimente și lichide în laboratorul de micobacteriologie;
- răsfoirea documentelor cu degetele umezite în gură;
- sugerea de bomboane sau gumă de mestecat;

Infectarea pe cale cutanată (prin înțepare)

- înțepare cu ace infectate, pipete Pasteur, cioburi de sticlă;
- plăgi cutanate (ale mâinilor în mod special) neprotejate.

Tabel II. Protecția individuală a personalului din laboratorul de diagnostic al TB

<i>Echipament</i>	<i>Caracteristicile echipamentului</i>	<i>Protejează și previne</i>	<i>Comentarii</i>
Salopetele de laborator, halatele sau uniforme	Să aibă mâneci lungi, să fie încheiate la spate dacă se lucrează la CPM.	Contaminarea îmbrăcăminții	Purtate tot timpul cât se lucrează în laborator. Halatul cu care se lucrează în LBS3/LBS2 nu trebuie să părăsească încăperea. Se pun în cuier diferit de cel în care se țin halatele purtate în restul laboratorului.
Șorț	Impermeabil	Contaminarea îmbrăcăminții	Purtate când se lucrează cu soluții și există riscul de stropire
Mănușile de protecție	Impermeabile, să acopere manșeta halatului	Contaminarea tegumentelor mâinilor, zgărirea	Purtate în timpul tuturor procedurilor care pot implica contactul direct sau accidental cu sânge, alte fluide sau materiale potențial infecțioase. Mănușile se scot aseptice și apoi se spală mâinile.
Ochelarii de protecție, ecranele de protecție facială	Să nu distorsioneze imaginea, să aibă corecția optică necesară operatorului	Contaminarea ochilor și a feței	Purtate ori de câte ori este necesară protecția ochilor și a feței de stropi, obiecte impactante și surse artificiale de radiații ultraviolete.
Încălțăminte de laborator	Talpă flexibilă, închisă în față	Protejarea degetelor și a labei piciorului	Purtată exclusiv în laborator
Mască respiratorie	FFP2, cu filtru HEPA, cu supapă, pliantă	Purifică aerul inspirat și previne contaminarea pe cale aeriană	Purtată când se prelucrează material infecțios în proceduri cu risc de generare de aerosoli sau stropi infecțioși.

Se recomandă:

- diminuarea generării de aerosoli infecțioși, prin manopere corecte, efectuate cu calm
- lucrul în CPM.
- purtarea măștilor tip HEPA - (high efficiency particulate air) - “respirator“, FFP2 cu supapă. Mască obișnuită, chirurgicală, nu conferă protecție.
- exhaustarea aerului (6-12 schimbări ale aerului/oră) și evitarea formării curenților turbulenți de aer în încăperea de lucru. Aerisirea încăperilor în pauzele de lucru.

- folosirea perelor de cauciuc pentru aspirare / pipetare.
- se va mânca și bea numai în încăpere special amenajată în acest scop.
- personalul trebuie să se spele pe mâini după mânuirea materialelor infecțioase și după scoaterea mănușilor de protecție, înainte de părăsirea zonei de lucru a laboratorului.
- dezinfectarea meselor la sfârșitul fiecărei etape de lucru.
- toate materialele (biologice, chimice, toxice) din laborator care ar putea pune în pericol sănătatea personalului trebuie să fie înregistrate în lista de inventariere, cu informații relevante despre fiecare agent în parte și pericolul pe care îl poate produce.
- în laborator trebuie să existe scrise și cunoscute de tot personalul procedura și conduita în caz de accident, indiferent de natura lui.

Sunt interzise:

- purtarea îmbrăcăminții protectoare de laborator în afara laboratorului (în cantine, camera pentru personal, saloane cu bolnavi, biblioteci, toalete etc) - pentru a evita eventuale contaminări ale spațiilor respective.
- încălțăminte decupată în partea din față (sandale) sau cu talpă rigidă și alunecoasă - pentru protejarea degetelor în caz de accident, respectiv pentru prevenirea alunecării.
- pipetarea cu gura- pentru evitarea contaminării pe cale digestivă.
- consumul de alimente, băuturi, machiajul și mânuirea lentilelor de contact în zonele de lucru ale laboratorului - pentru a nu se produce contaminare pe cale digestivă sau cutanată.
- depozitarea de alimente sau băuturi oriunde în zona de lucru a laboratorului - pentru evitarea contaminării acestora
- mestecatul gumei, sugerea bomboanelor, a capetelor creioanelor în laborator, umezirea degetelor pe limbă - pentru evitarea contaminării digestive.
- ghivece cu flori în laborator - pentru a nu constitui surse de micobacterii non-tuberculoase sau alți microbi/mucegaiuri.
- folosirea cutiilor din carton ca suport de transport pentru recipientele cu material infecțios, în locul celor din material plastic deoarece acestea nu pot fi dezinfectate, iar în cazul prelingerii materialului infecțios se poate contamina transportatorul sau / și mediul ambiant.
- folosirea stativelor din lemn sau carton pentru incubarea culturilor deoarece acestea nu pot fi dezinfectate.
- depozitarea îmbrăcăminții și încălțăminte care a fost utilizată în laborator în aceleași dulapuri cu îmbrăcămintea și încălțăminte de stradă.

Cabinetele de protecție microbiologică (CPM) și modul de folosire a lor sunt descrise în ”Standarde pentru laboratoarele de tuberculoză – condiții minime pentru asigurarea siguranței și eficienței activităților din laborator”.

Accidente posibile în laborator și conduita

Îndiferent de natura accidentului, nu trebuie să se producă panică. Se oprește imediat lucrul, se anunță șeful de laborator și se aplică măsurile de mai jos, în funcție de cantitatea estimată de aerosoli generați. Accidentele se notează în caietul special pentru acest tip de eveniment.

Indiferent de natura lor (chimice, infecțioase), toate accidentele se consemnează în documente destinate acestei categorii de evenimente, cu consecințele și măsurile care au fost luate, numele persoanelor expuse. Se interzice accesul în zonă până la finalizarea neutralizării infecțiozității.

Accidentele se pot produce în spațiul laboratorului sau în incinta CPM¹³.

În laborator (în afara CPM)

Accident cu producere de aerosoli în cantitate mică: spargerea unui tub cu cultură în mediul solid, vărsarea unui produs patologic.

- acoperă imediat cu prosop, șervete din hârtie sau halat pentru a limita aerosolizarea.
- umezește cu dezinfectant aflat la îndemână (soluție hipoclorit de sodiu 3-5%, soluție de fenol 5% în apă).
- lasă să acționeze cel puțin 2 ore, completând cu dezinfectant.
- strânge materialul - folosind echipament de protecție (halat, mănuși, mască HEPA, botoșei) și pune-l în sac autoclavabil.
- șterge cu dezinfectant mesele și dușumeaua.

Accident cu producere de aerosoli în cantitate mare: spargerea unuia sau mai multor tuburi care conțin bacili în suspensie în mediul lichid în cantitate mare, spargerea unui tub în centrifugă.

- părăsește încăperea,
- nu deschide centrifuga mai repede de 30 de minute,
- oprește exhaustarea (dacă există),
- nebulizează dezinfectant – lasă să acționeze cel puțin 2 ore,
- intră în încăperea cu echipament de protecție (halat, mănuși, mască HEPA, botoșei),
- acoperă cu prosop de hârtie, apoi îmbibă spăturile cu dezinfectant și lasă 30 min,
- strânge resturile și pune-le în sac autoclavabil,
- șterge cu dezinfectant mesele și dușumeaua.

În cabinetul de protecție microbiologică

Accident cu producere de aerosoli în cantitate mică: spargerea unui tub cu cultură în mediul solid, vărsarea unui produs patologic.

- NU opri funcționarea cabinetului,
- acoperă imediat cu prosop, cârpă, șervete din hârtie,
- îmbibă cu dezinfectant,
- lasă să acționeze cel puțin 30 de minute,
- strânge resturile, cu atenție la cioburi și pune-le în sac autoclavabil,
- șterge interiorul cabinetului cu dezinfectant, dar și mesele și dușumeaua.

Accident cu producere de aerosoli în cantitate mare (vărsare suspensie bacteriană, cultură în mediul lichid)

- NU opri funcționarea cabinetului,
- părăsește încăperea imediat și nu reveni mai repede de 4 ore,
- nebulizează dezinfectant: hipoclorit de sodiu 3-5%, lasă să acționeze cel puțin 2 ore,
- intră în încăperea cu echipament de protecție (mască HEPA, halat, mănuși, botoșei),
- strânge resturile și pune-le în sac autoclavabil,
- șterge cu dezinfectant mesele și dușumeaua,
- formolizează cabinetul.

Toate intervențiile necesare pentru anularea efectelor unui accident cu potențial infecțios în laborator se fac de către personal instruit, echipat special pentru a-i fi asigurată protecția personală.

Toate materialele folosite la neutralizarea focarului, deșeurile, echipamentul de protecție folosit se autoclavează sau se dezinfectează la sfârșitul operațiunii.

Departamentul de epidemiologie al spitalului trebuie să fie informat despre producerea accidentului și să supravegheze împreună cu medicul de medicina muncii starea de sănătate a personalului expus, timp de 12 luni.

Instruirea referitoare la aspectele legate de biosiguranța și biosecuritatea în laboratorul de TB trebuie să se adreseze întregului personal din laborator și să fie organizată anual.

3. Recepționarea și înregistrarea probelor în laborator

În laborator trebuie să fie amenajat un spațiu special pentru recepția probelor¹⁵.

Persoana cu calificarea și instruirea corespunzătoare, desemnată pentru recepția probelor trebuie să:

- verifice buletinul de solicitare dacă este corect întocmit și cuprinde toate datele de identificare ale pacientului, probelor, solicitantului și ale locului prelevării;
- înregistreze proba în Registrul de recepție a probelor;
- verifice dacă proba este corespunzătoare cantitativ și calitativ pentru analizele care se solicită;
- verifice dacă proba este ambalată corespunzător și nu prezintă semne de depreciere datorate ambalării și transportului necorespunzător.
- noteze ora primirii probei.

Dacă *proba nu corespunde* calitativ (ex. semne vizibile de contaminare bacteriană sau fungică, recipient fisurat, spart, produs intens hematic etc.) sau cantitate insuficientă pentru prelucrarea prin metodele solicitate, ea se respinge de la prelucrare și se menționează în registrul de recepție ca **probă neconformă**, cu menționarea neconformităților constatate la recepție, se informează clientul, solicitându-se, dacă este posibil, repetarea prelevării altei probe. Nu se returnează curierului, ci se consideră deșeu infecțios și va fi gestionată ca atare de către laborator. Se acceptă spre prelucrare sputa cu striuri rare de sânge, dar nu cea intens hematică (a se vedea mai sus, pag 17-18).

Când există îndoieli referitoare la adecvarea unei probe sau atunci când aceasta nu este conformă cu descrierea furnizată pe buletinul de solicitare, ori analiza solicitată nu este descrisă cu detalii suficiente, laboratorul se consultă cu clientul pentru informații adiționale, înainte de a respinge proba. Rezultatul discuției se va înregistra în documentele laboratorului^{4,15}.

Laboratorul trebuie să aibă un *sistem pentru identificarea unică a probelor*. Probele se codifică prin alocarea cronologică a numărului de ordine a comenzii din Registrul de laborator de Tuberculoză, care începe cu numărul 1 în fiecare an⁵, sau se recurge la sistemul local de identificare unică a probelor. Se acordă un indice (A;B) fiecărui eșantion provenit de la un bolnav, care este înregistrat la un anumit număr. Numărul și indicele este scris și pe ambalajul probei prin inscripționare cu marker care nu se poate șterge în timpul mănuiirii și transportului. **Identificarea alocată inițial este păstrată pe toată durata existenței probei în laborator, inclusiv a culturilor pozitive rezultate și antibiogramelor efectuate.**

Sistemul trebuie proiectat și aplicat astfel încât să asigure că probele nu pot fi confundate fizic sau atunci când se face referire la acestea în înregistrări sau documente.

Păstrarea probelor și contraprobelor

Din momentul recepției până la repartizarea pentru analiză, probele se păstrează pentru maxim 1 oră în condiții care să nu afecteze rezultatele obținute (frigider, masă), să nu se deterioreze probele, sau să nu se piardă.

Dacă probele ajung târziu în laborator și nu mai pot fi prelucrate în aceeași zi, ele trebuie să fie depozitate în frigiderul destinat păstrării lor, la temperatură cuprinsă între +4°C și + 8°C, iar condițiile de păstrare trebuie menținute, monitorizate și înregistrate.

La mânăuirea probelor trebuie avut în vedere că ambalajul și etichetele ar putea fi contaminate și se va evita orice diseminare în laborator a contaminării microbiene prin folosirea de suporturi/tăvi care pot fi dezinfectate, atât pentru depozitarea în frigider cât și pe masa de lucru. Este recomandabil să fie păstrate contraprobe (produsul rămas în recipientul original după preluarea porțiunii de prelucrat) pentru cel puțin pentru 24 de ore, în frigider, separat de probele neprelucrate încă. Fiecare contraprobă este identificată cu numărul din registrul de laborator de TB. Aceasta poate fi folosită pentru repetarea aceleiași analize, în cadrul CIC, sau pentru efectuarea de teste adiționale.

4. Prelucrarea probelor pentru microscopie și cultură

Examenul microscopic

Examinarea microscopică are avantajul că este simplă, rapidă, economică și contribuie la identificarea surselor de infecție⁶. Chiar dacă specificitatea este înaltă, sensibilitatea metodei este limitată, rezultatul pozitiv fiind obținut doar atunci când produsul examinat conține mai mult de 5000 bacili/ml de produs patologic. Între limite trebuie amintit faptul că identifică bacilii acido-alcoolor rezistenți dar nu identifică specia de micobacterii, nu face distincție între bacilii viabili și cei neviabili, nici între cei sensibili și cei cu rezistență¹⁶.

În anul 1938 Hagemann crește sensibilitatea examinării microscopice cu 10% prin colorarea fluorescentă cu auramină (și examinare la microscopul cu lumină ultravioletă-UV), cu păstrarea aceleiași specificități cu colorația ZN. Devine astfel posibilă citirea unui număr mai mare de frotiuri (peste 35/zi). Microscopia fluorescentă tradițională (examinarea în lumină ultravioletă emisă de lampi cu mercur) este scumpă, dar folosind microscopie cu LED-UV (light-emitting diodes) devine mai ieftină și este la fel de sensibilă¹⁷.

Principiul metodei: Conținutul bogat în acizi micolici din structura peretelui micobacterian face ca aceste bacterii să fixeze la cald compuși de anilină (fuchsina), sau substanțe fluorescente - fără încălzire (auramina, auramina-rhodamina) colorantul rezistând la decolorarea cu alcool acidulat, de aici și denumirea de bacili acido-alcoolor-rezistenți (BAAR)¹⁸. Pentru ușurarea examinării este necesară colorarea fondului preparatului (albastru de metilen în cazul colorației ZN). În cazul colorației fluorescente este necesară cuparea fluorescenței preparatului (cu albastru de metilen sau permanganat de potasiu).

După recepție, probele recoltate de la pacienți sunt înregistrate și identificate prin numerotare unică și predate executanților de analiză.

Indiferent dacă laboratorul folosește metoda directă sau metoda cu centrifugare /concentrare, la *pregătirea spațiului de lucru* se parcurg aceiași pași:

1. executantul trebuie să poarte echipamentul de protecție individuală (halat cu mâneci lungi, închis la spate, mănuși, mască FFP2 cu supapă, capelină),
2. pregătește suprafața de lucru din CPM prin ștergere cu alcool 70% și așteaptă cel puțin 3 minute, după care poate șterge cu un șervet de hârtie,
3. așează în toată aria de lucru din interiorul CPM hârtie îmbibată cu dezinfectant tuberculucid (fără acoperirea orificiilor pentru recircularea aerului),
4. pune în interiorul CPM strict materialele necesare, fără aglomerare inutilă,
5. marchează lamele cu numărul complet din registru și așează-le în ordine în interiorul CPM,
6. pornește funcționarea CPM și așteaptă stabilizarea fluxului de aer 3-5 min,
7. nu ține mai multe tuburi deschise la un moment dat - pentru a evita contaminarea încrucișată între probe
8. ține înclinate tuburile deschise, la cel puțin 15 cm de fanta frontală.
9. așază la îndemână recipientul pentru colectarea deșeurilor infecțioase.

Prepararea frotiurilor pentru examinarea directă¹

1. așază în ordinea numerelor flacoanele cu produsele de prelucrat,
2. așază în ordine lamele numerotate,

3. ia cu ansa bacteriologică de unică folosință sau cu pipeta de unică folosință porțiuni purulente din produs (spută), cca 100 μ l și etalează cât mai uniform pe centrul lamei pe o arie de 1x 2 cm, maxim 1x2,5 cm. Întinde produsul uniform pe lamă, în strat subțire astfel încât atunci când este uscat să permită să se vadă prin el literele unui text,
4. pentru uscare și fixare așează lamele cu frotiuri pe plita cu termostatare (65-75⁰C) și așteaptă cel puțin 2 ore înainte de etapa următoare.

Prepararea frotiurilor pentru examinarea după concentrare/centrifugare: Petroff (NaOH/HCl sau KH₂PO₄)^{1,2,16}

1. așează în ordinea numerelor flacoanele cu produsele de prelucrat în interiorul CPM,
2. așează în interiorul CPM stativul cu tuburi de centrifugă (tip Falcon, de 50 ml) marcate cu numerele care corespund probelor de prelucrat,
3. transferă cu pipetă Pasteur sterilă, de unică folosință, cu pară integrată o cantitate cât mai mare din produsul de prelucrat (ideal 10 ml, minim 2 ml) în tubul de centrifugă, Pentru fiecare probă folosește câte o pipetă. Este de dorit să nu fie atinsă cu pipeta gura tubului pentru centrifugă,
4. repartizează în fiecare tub o cantitate egală cu cea a produsului, din soluția de NaOH 4% (ținută cel puțin 30 minute la temperatura camerei înainte de folosire) fără să atingi cu dispenserul gura sau perețele interior al tubului. Concentrația finală a NaOH este de 2% în această etapă,
5. închide bine tuburile și agită manual energic sau cu vortex la 2500 rpm. 15-30 secunde, pentru lichefiere. Inversează de câteva ori tubul astfel încât soluția să vină în contact și cu produsul de pe pereții tubului. Reașează tuburile în stativ,
6. fixează ceasul să sune la 15 minute de la adăugarea soluției decontaminante la prima probă,
7. verifică după 10 minute dacă proba este complet lichefiată. Dacă este necesar, mai agită manual sau la vortex timp de 15-30 secunde. Trebuie ca timpul total de contact produs/decontaminant să nu depășească 20 minute,
8. la expirarea timpului de decontaminare/lichefiere se neutralizează conținutul tuburilor cu soluție HCl 8% sau soluție de Na₂KPO₄, în prezența unui indicator de pH (albastru de bromtimol),
9. completează cu tampon fosfat sau apă distilată până la 50 ml (capacitatea tubului) așează tuburile în centrifuga cu răcire setată la temperatura cuprinsă între 4-12⁰ C, la FRC 3000xg și durata de 20 minute,
10. la terminarea centrifugării scoate tuburile din centrifugă, decantează atent și complet supernatantul (în recipient cu pâlnie, care conține substanță tuberculică) apoi adaugă 2,5 ml apă distilată sau tampon fosfat (pH 6,8) în care resuspenzi sedimentul prin agitare ușoară și prin pipetare fără barbotare. Lucrează steril, cu pipetă nouă pentru fiecare probă. Folosește o parte din sediment pentru prepararea frotiului, iar restul pentru cultură,
11. însămânțează mai întâi 2 tuburi cu mediul LJ și un tub cu mediul lichid, apoi, cu aceeași pipetă, efectuează frotiul,
12. ia cu pipeta una-două picături (cca 100 μ l) și dispersează lichidul pe partea centrală a lamei marcate cu numărul corespunzător al probei, pe o arie de 1x2 cm, maxim 1x2,5 cm. Suprafața pe care se usucă lamele trebuie să fie orizontală pentru a nu se prelinge lichidul,
13. pentru uscare completă și fixare așează lamele cu frotiuri pe plita cu termostatare (65-75⁰C) și așteaptă cel puțin 2 ore înainte de etapa următoare.

Dacă laboratorul nu este dotat cu centrifugă conformă, se sare de la punctul 8 la 12.
--

1. așează în ordinea numerelor flacoanele cu produsele de prelucrat în interiorul CPM,
2. așează în interiorul CPM stativul cu tuburi de centrifugă marcate cu numerele care corespund probelor de prelucrat,
3. transferă cu pipetă Pasteur sterilă, de unică folosință, cu pară integrată o cantitate cât mai mare din produsul de prelucrat (ideal 10 ml, minim 2 ml) în tubul de centrifugă. Pentru fiecare probă folosește câte o pipetă. Este de dorit să nu fie atinsă cu pipeta gura tubului pentru centrifugă,
4. repartizează în fiecare tub o cantitate egală cu cea a produsului, din soluția de NALC-NaOH proaspăt preparată, fără să atingi gura tubului sau peretele interior al lui. Concentrația finală a NaOH este de 1% în această etapă. Închide bine tuburile și agită *manual, blând, prin inversarea tubului de 3-4 ori sau cu vortex la 60-maxim 80 rpm* (deoarece aerarea puternică determină oxidarea și pierderea calității lichefiante a NALC), timp de 15-30 secunde pentru lichefiere. Inversează de câteva ori tubul astfel încât soluția să vină în contact și cu produsul de pe pereții tubului sau de pe capac. Reașează tuburile în stativ,
5. fixează ceasul să sune la 15 minute de la adăugarea soluției decontaminante la prima probă,
6. verifică după 10 minute dacă proba este complet lichefiată. Dacă este necesar, mai adaugă 50 mg pudră NALC și agită la vortex 15-30 secunde. Trebuie ca timpul total de contact produs/decontaminant să nu depășească 20 minute,
7. la expirarea timpului de decontaminare/lichefiere, la conținutul tuburilor se adaugă tampon fosfat steril (pH 6,8) până la marca de 50 ml (capacitatea tuburilor),
8. așează tuburile în centrifuga cu răcire setată la temperatura cuprinsă între 4-12⁰ C, la FRC 3000xg și durata de 20 minute,
9. la terminarea centrifugării, scoate tuburile din centrifugă, decantează atent și complet supernatantul (în recipient cu pâlnie, care conține substanță tuberculucidă) apoi adaugă 2,5 ml tampon fosfat (pH 6,8) în care resuspenzi sedimentul prin agitare ușoară și prin pipetare fără barbotare. Lucrează steril, cu pipetă nouă pentru fiecare probă. O parte se folosește pentru prepararea frotiului, iar restul pentru cultură. Însămânțează mai întâi 2 tuburi cu mediul LJ și un tub cu mediul lichid (sau 3 tuburi LJ), apoi, cu aceeași pipetă efectuează frotiul,
10. ia cu pipeta una-două picături (cca 100 microlitri) și dispersează lichidul pe partea centrală a lamei marcate cu numărul corespunzător al probei, pe o arie de 1x2 cm, maxim 1x2,5 cm. Suprafața pe care se usucă lamele trebuie să fie orizontală pentru a nu se prelinge lichidul, iar grosimea frotiului rezultat să fie uniformă,
11. pentru uscare completă și fixare așează lamele cu frotiuri pe plita cu termostatare (65-75⁰C) și așteaptă cel puțin 2 ore înainte de etapa următoare.

- **Etapa de centrifugare este obligatorie dacă se folosește această metodă de decontaminare.**
- **Metoda este rezervată laboratoarelor care au în dotare centrifugă conformă.**
- **Este recomandată pentru folosire în cazul cultivării pe mediul lichid Middlebrook 7H9.**
- **Este necesară validarea metodei în laborator înainte de folosirea de rutină.**

Colorarea frotiurilor

Colorația Ziehl Neelsen^{18,19}

1. pune lamele cu frotiurile fixate pe suportul de colorare fără să se atingă între ele.
2. acoperă complet frotiurile cu soluție 0.3% de fuchsină fenicată proaspăt filtrată.

3. treci pe sub frotiuri flacăra unui bec de gaz până la emiterea de vapori, fără să fiarbă colorantul. Repetă acțiunea de 3-4 ori în primele 3 minute. Completează cu fuchsină dacă aceasta s-a uscat sau s-a scurs de pe lamă. Lasă până la 10 minute.
4. spală cu jet slab de apă de robinet și scurge apa.
5. acoperă frotiul cu alcool-acidulat 3% și lasă-l pentru decolorare maxim 3 min. Repetă decolorarea dacă frotiul rămâne roșu.
6. spală din nou cu jet slab de apă de robinet și scurge apa.
7. acoperă frotiul cu albastru de metilen 0,3% timp de 30 sec., maximum 1 minut.
8. spală blând sub jet de apă de robinet și scurge apa.
9. șterge colorantul de pe dosul lamei cu șervet îmbibat în alcool medicinal.
10. usucă frotiurile în poziție înclinată în suport de lame la temperatura camerei. Nu încălzi lamele pentru grăbirea uscării.

Examinează la microscop optic: ocular 10x, obiectiv cu imersie 100x (mărire 1000x).

Colorația fluorescentă (Auramină O, sau Auramină-Rhodamină)^{2,16}

1. acoperă frotiul fixat cu soluție 0,1% auramină O (sau Auramină-Rhodamină)
2. lasă 15 minute la temperatura camerei, *fără încălzire*
3. spală blând cu *apă distilată*, apoi scurge apa de pe lamă,
4. acoperă frotiul cu acid - alcool 3% și lasă pentru decolorare 2 minute,
5. spală blând cu apă distilată, apoi scurge excesul de apă,
6. acoperă frotiul cu permanganat de potasiu 0,5% sau albastru de metilen 0,3% timp de 2 minute (pentru eliminarea fluorescenței nespecifice a fondului). Prelungirea contactului cu permanganatul de potasiu peste 4 minute determină scăderea fluorescenței BAAR!
7. spală cu apă distilată apoi scurge excesul de apă,
8. lasă la uscat în poziție înclinată în suportul de lame, la aer. Nu forța uscarea.

Examinează la microscopul cu fluorescență (UV) imediat după uscare folosind oculare de 10x și obiective de 20-25x și 40-45x.

Note:

- În toate etapele de spălare pentru colorația cu fluorocromi *se folosește numai apa distilată*. Nu se folosește apa de la robinet deoarece clorul conținut de aceasta poate interfera cu fluorescența.
- Indiferent de metoda de preparare a frotiurilor, ele trebuie lăsate să se usuce la aer, ferite de raze UV, pe plita cu termostatare din interiorul CPM, de unde sunt scoase pentru colorare.
- Toate materialele folosite (pipete, anse, tuburi) se colectează în recipiente pentru materiale infecțioase și se autoclavează înainte de îndepărtarea din laborator.
- Frotiurile pozitive BAAR în fluorescență se pot recolora ZN, pentru confirmarea rezultatelor. Nu este necesară decolorare prealabilă.
- Dacă nu pot fi examinate imediat, frotiurile colorate cu fluorocromi se pot păstra la întuneric, la 4-8⁰ C pentru 24 ore. Fluorescența scade după 24 de ore.
- Odată colorate prin metoda ZN, frotiurile nu mai pot fi recolorate fluorescent.
- Se colorează zilnic frotiu de control pozitiv BAAR, iar la schimbarea lotului de colorant se colorează și frotiuri de control negativ BAAR.

Examinarea frotiurilor

La microscopul optic

- numără BAAR (care apar ca bastonașe roșii pe fondul albastru al preparatului), din 100 câmpuri microscopice examinate (2 cm lungime).
- grupurile compacte de mai mulți bacili se numără ca UFC și se consemnează ca atare în caietul de lucru.
- examinează obligatoriu cu ocular 10x și obiectiv 100x, folosind ulei pentru imersie.
- dacă nu vizualizezi nici un BAAR la 100 câmpuri examinate, consideră rezultat negativ BAAR doar după ce ai examinat 300 câmpuri microscopice.
- rezultatele se exprimă semicantitativ. (tabelul III)

La microscopul cu fluorescență (UV)

- numără BAAR (care apar ca bastonașe galben fluorescent pe fondul întunecat al preparatului).
- numără grupurile compacte de mai mulți bacili ca UFC.
- examinează cu ocular de 10x și obiectiv de 20 - 25x pentru orientare și cu obiectiv 40-45x pentru detalii.
- dacă nu vizualizezi nici un BAAR la 1000 câmpuri examinate (obiectiv 20-25x și o lungime de 2 cm frotiu), consideră rezultat negativ BAAR. Rezultatele se exprimă semicantitativ. (tabelul III)

Interpretarea și raportarea rezultatelor

Rezultatele se exprimă semicantitativ, conform tabelului III, iar raportarea se face pe buletinele de solictare tip PNPSCT, conform recomandărilor. Se marchează obligatoriu metoda folosită.^{2,4}

Tabel III. Exprimarea semicantitativă a rezultatelor examenului microscopic și raportarea rezultatelor

Scala IUATLD/ WHO	Ziehl-Neelsen, mărire 1000x: 1 lungime = 2 cm =100 CME ^a	Mărirea în examinarea fluorescență	
		Mărire 200-250x: 1 lungime = 2 cm = corespund la 1000 CME ^a din mărirea de 1000x	Mărire 400-x: 1 lungime = 2 cm = corespund la 400 CME ^a din mărirea de 1000x
Rezultat			
NEGATIV BAAR	0 BAAR/1 lungime	0 BAAR/1 lungime	0 BAAR/1 lungime
Numărul exact de BAAR / 1 lungime	1-9 BAAR/1 lungime	Împarte numărul BAAR observați la 10	Împarte numărul BAAR observați la 4
POZITIV BAAR 1+	10-99 BAAR / 1 lungime		
POZITIV BAAR 2+	1-10 BAAR / câmp, în medie		
POZITIV BAAR 3+	> 10 BAAR / câmp, în medie		

a. CME: câmpuri microscopice examinate

Rezultatul cu 1-3 BAAR se va interpreta cu prudență, fiind necesară repetarea examinării dintr-un alt eșantion de spută.

La examinarea cu microscopul UV, la mărire de 200-250x, lungimea de 2 cm este acoperită de 30 câmpuri microscopice, care corespund la 1000 câmpuri examinate în microscopie optică; la mărire de 400x, lungimea de 2 cm este acoperită de 40 câmpuri microscopice, care corespund la 400 câmpuri examinate în microscopie optică.^{2, 16} Pentru a nu se crea confuzii la raportarea rezultatelor, în cazul folosirii colorației fluorescente trebuie aplicat un factor de corecție, astfel: se împarte numărul BAAR citiți la 10 dacă citirea s-a făcut la mărire de 200-250x, sau se împarte la 4, dacă citirea s-a făcut la mărire de 400-450x.¹⁶ Pentru frotiurile intens pozitive se citesc cel puțin 25 câmpuri microscopice înainte de formularea rezultatului (la mărire de 1000x).

Toate rezultatele eliberate trebuie să aibă calitatea asigurată, dar uneori este posibil să se producă erori, începând de la momentul recoltării produselor de la bolnavi, până la eliberarea rezultatelor. Erorile posibile constituie elemente de risc pentru calitate și trebuie cunoscute de către personalul de laborator pentru a le putea preveni^{2,4,16,20} (tabelul IV).

Tabel IV. Evaluarea riscului examenului microscopic pentru evidențierea BAAR

Etapa	Sursa erorii	Prevenirea erorii
Recoltarea produsului patologic, transportul	Produs patologic necorespunzător calitativ și/sau cantitativ. Neglijență în etichetarea recipientului cu produsul patologic. Recipient inadecvat.	Instruirea personalului care recoltează sau supraveghează recoltarea. Instruirea pacienților. NU eticheta capacul. Lipește eticheta cu date de identificare pe corpul flaconului înainte de recoltare. Completează toate rubricile din biletul de solicitare tip.
Recepție Înregistrare	Etichetă lipită pe capac. Date incomplete în biletul de solicitare.	Eticheta cu datele de identificare să fie lipită <i>pe corpul</i> flaconului. Înregistrează datele în registrul laboratorului, și alocă fiecărui prelevat un număr unic, scris obligatoriu pe corpul flaconului.
Lama	Lamă refolosită, zgâriată, nedegresată sau cu fluorescență proprie.	Folosește lame noi, cu calitate verificată. Degresează lamele înainte de folosire.
Marcarea lamei	Cu tuș solubil în alcool- tip marker permanent, cu ștergerea în timpul colorării. Cu creion de ceară, pe dosul lamei, cu număr incomplet sau numărul zilei.	Marcare cu creion de grafit, pe fața lamei, în porțiunea matisată de la capătul ei. Numărul complet din registru, cu indicele prelevatului (A,B) Prin zgârierea cu diamant a numărului.
Efectuarea frotiului	Frotiu prea subțire, prea gros. Frotiu prea mic, prea mare. Grosime neuniformă	Selectează fragmente purulente din spută. Etalează pe o arie de 1x2 cm, maxim 1x3cm, în porțiunea centrală a lamei. Lucrează cu calm și atenție.

Etapa	Sursa erorii	Prevenirea erorii
Fixarea	Fixarea la flacără înainte ca frotiul să fie complet uscat.	Așteaptă uscarea completă a frotiurilor înainte fixarea la flacără. Uscarea și fixarea folosind plită termostată, la 65-75°C, timp de 2 ore.
Colorarea	Lame puse lipite unele de altele pe suportul de colorare. Colorant nefiltrat. Soluție de lucru cu concentrație greșită. Capacitate colorantă slabă. Soluția de fucsină fierbe sau se usucă pe lamă (ZN). Încălzire insuficientă a soluției de fucsină (ZN). Încălzirea soluției fluorescente.	Așează distanțat lamele pe suportul de colorare, soluția de colorant să nu se prelingă de pe o lamă pe cele învecinate. Filtrează soluția de lucru înainte de folosire. Schimbă zilnic hârtia folosită la filtrare. Balanță etalonată, verificată metrologic, sticlărie etalonată. Respectă rețetele de preparare a soluțiilor. Folosește soluțiile în termenul de valabilitate. Folosește reactivi cu certificat de calitate, cu puritate cunoscută. Colorează cu auramină fără încălzire.
Decolorare	Decolorant în concentrație necorespunzătoare. Decolorare neuniformă sau insuficientă.	Scurge complet apa rămasă pe lamă după fiecare spălare. Verifică calitatea reactivilor folosiți. Respectă rețeta de preparare a soluțiilor. Acoperă complet lama cu soluția de decolorare.
Recolorare/ colorarea fondului	Concentrație necorespunzătoare a soluției. Colorare prea intensă. Colorare insuficientă. Lame cu fluorescență proprie.	Scurge complet apa rămasă pe lamă după spălare. Verifică calitatea reactivilor folosiți. Respectă rețeta de preparare și timpii de colorare. Respectă instrucțiunile de colorare furnizate de producător împreună cu chitul de colorare. Verifică data preparării soluției și folosește în termenul de valabilitate. Folosește reactivi cu certificat de calitate, cu puritate cunoscută. Acoperă complet lama se cu soluția de albastru de metilen (sau permanganat). Verifică fluorescența lamelor înainte de folosirea unui lot nou.
Spălarea între etapele de colorare și la final	Spălare energetică, cu jet de apă pe mijlocul lamei, cu dezlipirea de fragmente de frotiu. Folosirea apei de robinet în cazul colorației fluorescente.	Spală cu jet slab de apă, lăsat să se prelingă de la un capăt spre celălalt al lamei. Folosește apă distilată pentru colorația fluorescentă.
Uscarea finală	La termostat	În suport pentru lame, în poziție înclinată, la temperatura camerei.
Examinarea la microscop	BAAR rămași pe obiectiv de la o examinare anterioară. Uleiul de imersie conține BAAR (ZN).	Curățarea obiectivului după fiecare examinare. La aplicarea picăturii de ulei de imersie nu se atinge frotiul cu aplicatorul (ZN). Marcarea corectă a lamei. Pentru rezultat negativ se citesc cel puțin 300

Etapa	Sursa erorii	Prevenirea erorii
	Numărul de identificare șters în timpul colorării. Citirea unui număr mic de câmpuri microscopice.	câmpuri microscopice. Personal instruit și verificat periodic. Sistem pentru CIC-M implementat.
Raportarea rezultatului	Transcrierea greșită a rezultatului în registru, în buletinul de analiză, în baza de date.	Lucrează cu calm și atenție. Instruirea personalului referitoare la consecințele erorilor.

Cultivarea micobacteriilor

Cultura are sensibilitate mai mare decât microscopia (10-100 bacili/ml produs patologic)²⁴, distinge bacilii viabili și este necesară pentru monitorizarea tratamentului tuturor pacienților, dar în mod particular al celor cu multirezistență (TB-MDR), oferă diagnosticul definitiv de TB, crește numărul cazurilor diagnosticate cu 30-50% (mediul LJ), permite detectarea cazurilor înainte ca ele să devină infecțioase, oferă izolate pentru ABG^{2,25}. Cultivarea micobacteriilor necesită condiții de biosiguranță de nivel 2^{14,21}.

Pentru cultivare sunt folosite medii solide, pe bază de ou sau pe bază de agar, dar și medii lichide, care pot aduce un plus de pozitivitate de până la 10% față de mediul solid. Dintre mediile solide pe bază de ou amintim mediul LJ, folosit în țara noastră, iar dintre cele lichide, mediul Middlebrook 7H9, folosit în sisteme automate de cultivare Bactec MGIT 960, BacT/ALERT(MB/BacT) și mai recent la noi, VersaTREK.

Cultura în mediul lichid este complexă, costisitoare, necesită personal instruit, nu oferă informații asupra numărului de colonii precum mediul LJ, fiind calitativă, are o rată mai mare de contaminare decât cultura în mediul solid și este mai scumpă decât aceasta.^{25,26}

Metode de decontaminare

Sputa, produsul de elecție pentru diagnosticul TB pulmonare, dar și alte produse recoltate sunt contaminate cu microbi din microbiocenoza traseului de eliminare. Prezența acestora afectează calitatea mediilor folosite pentru cultură și este necesară eliminarea lor înainte de însămânțare, prin prelucrare corespunzătoare.

Când cultivăm micobacteriile trebuie să avem în vedere trei aspecte importante²⁵:

- Eliberarea bacililor din mucusul și detritusurile celulare care îi înconjoară,
- Viabilitatea bacteriilor nu trebuie să fie afectată mai mult decât este necesar nici prin omogenizare, nici prin decontaminare sau centrifugare,
- La omogenizare și decontaminare trebuie să avem în vedere: rezistența MT la soluții de baze și acizi; durata expunerii la aceste substanțe; temperatura din timpul centrifugării; eficiența centrifugii pentru sedimentarea bacililor.

Nici una dintre metodele de decontaminare folosite nu reușește să conserve micobacteriile în totalitate, chiar în condițiile unei tehnici de lucru impecabile, de aceea trebuie să stabilim un echilibru între pierderea unei părți a bacililor și rata acceptabilă de contaminare a culturilor.

Alegerea tehnicii pentru decontaminare trebuie să țină seama de dotarea tehnică a laboratorului și de calificarea personalului. Vor fi folosite doar metode verificate și validate.

Metoda de decontaminare cu NaOH (Petroff)^{3,4,20,22,25}

Principiu

NaOH în soluție 4% (concentrație finală 2%) are atât efect mucolitic cât și bactericid asupra majorității microbilor. Înainte de însămânțare este necesară neutralizarea NaOH cu soluție de HCl 8% sau fosfat monopotasie 15% în prezența unui indicator de pH.

Avantaj: Metoda este accesibilă din punct de vedere tehnic, reactivii sunt ieftini și stabili câteva luni.

Dezavantaje: timpul de contact cu hidroxidul trebuie să fie strict respectat; este destul de agresivă, distrugând până la 60% din bacilii tuberculozei, la care se adaugă bacilii omorâți în timpul centrifugării (efectul încălzirii și eficiența centrifugii).

Timpul necesar prelucrării unei probe este de aproximativ 60 minute, iar prelucrarea a 20 de probe durează aproximativ 120 minute, capacitatea centrifugii fiind elementul limitativ.²⁵

Pregătirea spațiului de lucru este aceeași indiferent de metoda folosită:

1. executantul trebuie să poarte echipamentul de protecție individuală (halat cu mâneci lungi, închis la spate, mănuși, mască FFP2 cu supapă, capelină),
2. pregătește suprafața de lucru din CPM prin ștergere cu alcool 70%, și așteaptă cel puțin 3 minute, după care se șterge cu un șervet de hârtie,
3. așează pe toată aria de lucru din interiorul CPM hârtie îmbibată cu dezinfectant tuberculicid (fără acoperirea orificiilor pentru recircularea aerului),
4. pune în interiorul CPM strict materialele necesare, fără aglomerare inutilă,
5. pornește funcționarea CPM și așteaptă 3- 5 min stabilizarea fluxului de aer,
6. nu ține mai multe tuburi deschise la un moment dat pentru a evita contaminarea încrucișată între probe,
7. ține înclinate tuburile deschise, la cel puțin 15 cm de fanta frontală.

Prelucrarea probelor biologice pentru cultivarea după concentrare/centrifugare: metoda Petroff (NaOH/ HCl sau KH_2PO_4)^{1,2,20,25} este descrisă în capitolul "Examinarea microscopică"

Metoda de decontaminare/omogenizare cu NALC-NaOH^{2,20,22,25}

Principiu

N-acetil-L-cisteina (NALC) este un agent mucolitic utilizat pentru digestia rapidă, care permite ca agentul decontaminant, NaOH, să aibă o concentrație finală de 1%. Tamponul fosfat neutralizează NaOH și diluează omogenatul pentru a reduce vâscozitatea anterior centrifugării.

Avantaj: sunt omorâte doar circa 30% din micobacteriile din proba clinică.

Dezavantaje: NALC își pierde activitatea destul de repede, de aceea soluția de lucru trebuie preparată zilnic. Ionii metalelor grele prezenți în spută afectează efectul mucolitic al NALC și pentru legarea lor este necesar adaosul de soluție de citrat de sodiu. Agitarea prea energică, cu aerarea soluției NALC îi scade activitatea mucolitică.

Pentru centrifugarea probei se folosește o FRC de 3000xg, timp de 20 minute pentru sedimentarea micobacteriilor, în centrifugă cu răcire, la 4-12°C.

Timpul necesar procesării unei probe este de aproximativ 40 minute, iar procesarea a 20 de probe durează aproximativ 60 minute, elementul limitativ fiind capacitatea centrifugii.

Metoda NALC-NaOH poate fi folosită doar dacă laboratorul este dotat cu centrifugă conformă, personalul a fost instruit, iar metoda a fost verificată și validată în laborator, acest lucru trebuind să fie documentat.

Etapă de centrifugare este obligatorie dacă se folosește această metodă de decontaminare.

Este recomandată pentru folosire în cazul cultivării pe mediul Middlebrook 7H9.

Prelucrarea probelor biologice după concentrare/centrifugare: metoda NALC-NaOH^{1, 2,20,25} este scrisă în capitolul "Examinarea microscopică".

Însămânțarea

Probe prelucrate/ decontaminate cu NaOH 4%

- Însămânțează câte 4 picături (0,2 ml) în câte 2 tuburi cu mediul LJ și 0,5 ml într-un tub cu mediul lichid, (sau 3 tuburi cu mediul LJ) apoi, cu aceeași pipetă efectuează frotiul, în cazul metodei cu centrifugare.
- Dacă nu s-a folosit centrifugarea, ci metoda „cu picătura”, însămânțează din omogenatul rezultat câte 4 picături (0,2 ml) în câte 2 tuburi cu mediul LJ și 0,5 ml într-un tub cu mediul lichid (sau 3 tuburi cu mediul LJ).

Probe prelucrate/decontaminate cu NaOH/NALC

- Însămânțează 2 tuburi cu mediul LJ cu câte 4 picături (0,2 ml) și 0,5 ml sau până la maxim 1 ml, într-un tub cu mediul lichid, în funcție de recomandarea producătorului pentru fiecare tip de echipamentul folosit, (sau 3 tuburi cu mediu LJ).

Incubarea

Mediul LJ

- Inundă suprafața mediului cu lichidul însămânțat și așează tuburile înclinat, cu suprafața mediului în sus, într-un suport special pentru incubare în primele 48-72 ore, cu capacul parțial deșurubat (o spiră).
- După 48-72 ore examinează tuburile, elimină-le pe cele cu contaminare (scriind în caietul de lucru) și incubează celelalte tuburi în poziție verticală până la pozitivare sau până la maxim 60 de zile de la însămânțare. Se închid complet capacele.

Mediul lichid Middlebrook 7H9

- Incubarea se face în sistem automat și se respectă instrucțiunile producătorului, prezentate în continuare.

Citirea

Mediul LJ

- manual, la 21, 30, 45, 60 zile. Dacă volumul de lucru permite, se poate face și citire săptămânală.

Mediul lichid

- automat, indiferent de sistemul de cultivare, cu raport pozitiv (la 1-42 zile) sau negativ (la 42 zile).

Interpretarea rezultatelor

- Apreciază morfologia macroscopică a coloniilor (descrie în caietul de lucru pentru citirea culturilor),
- Prepară frotiu colorat ZN pentru a evidenția prezența BAAR,
- **Efectuează obligatoriu test imunocromatografic rapid AgMPT64 pentru confirmarea apartenenței la complexul *M. tuberculosis*^{2,26}.**

Raportarea rezultatelor

- Rezultatele culturilor pe mediul LJ se exprimă semicantitativ (tabel V) iar cele ale culturilor în mediul lichid, calitativ: pozitiv/negativ.
- Raportarea se face pe buletinele de solictare tip PNPSCT, conform recomandărilor. Trebuie menționată/ marcată metoda folosită.

Tabel V. Exprimarea semicantitativă a rezultatelor culturii pe mediul solid tip Lowenstein Jensen

CREȘTEREA MICOBACTERIILOR ^a	NOTAREA REZULTATULUI
Creștere bacteriană absentă ^b	NEGATIV
Sub 30 colonii	POZITIV- număr exact de colonii
30-100 colonii	POZITIV 1+
Peste 100 colonii izolate	POZITIV 2+
Colonii confluențe nenumarabile	POZITIV 3+
Creșterea altor microbi decât micobacterii	Cultură contaminată

Legenda: a- Complexul *M. tuberculosis* identificat sau NTM (cu precizarea speciei după identificare); b- Mediul sa nu fie deshidratat în exces, iar aspectul său să nu fie modificat.

Pe buletin se scrie doar dacă cultura pozitivă aparține complexului *M. tuberculosis* sau este NTM, fără a specifica testele folosite pentru identificare, care rămân doar în documentele laboratorului. Persoana care validează rezultatul și semnează buletinul este răspunzătoare pentru corectitudinea rezultatului.

Așemeni examenului microscopic, prin cultură trebuie să oferim rezultate cu calitate asigurată. În toate etapele de lucru sunt posibile erori care pot afecta calitatea rezultelelor finale, de aceea personalul trebuie să fie instruit, să cunoască greșelile posibile și modalitățile de evitare a lor. (Tabelul VI)

Tabel VI. Riscuri de eroare la cultivarea în mediul solid Lowenstein Jensen

Etapa	Greșeli posibile	Prevenirea greșelii
Recoltarea produsului patologic, transportul	Produs patologic necorespunzător calitativ și/sau cantitativ Neglijență în etichetarea recipientului în care s-a recoltat produsul patologic. Recipient inadecvat prelevatului.	Instruirea personalului care recoltează sau supraveghează recoltarea. Instruirea pacienților. Nu eticheta capacul, ci corpul flaconului cu produs. Completează toate rubricile din biletul de solicitare tip.
Recepția Înregistrarea	Etichetă lipită pe capac. Date incomplete în biletul de solicitare	Eticheta cu datele de identificare să fie lipită <i>pe corpul</i> flaconului. După scrierea datelor în registrul laboratorului, fiecărui prelevat i se alocă un număr, care va fi scris pe corpul flaconului și nu pe capac.
Mediul Lowenstein Jensen	Mediu neverificat calitativ. Nefectuirea CIC-C.	Folosește medii verificate, cu certificat de calitate și conformitate. Efectuează CIC pentru mediul de cultură. Participă la programe de CEC.
Marcarea tuburilor cu mediul de cultură	Număr incomplet, fără precizarea indicelui produsului, ștergerea lui de pe tub în timpul mânăuirii. Scrișul maschează zona de creștere a coloniilor.	Scrie cu tuș solubil în alcool- tip marker permanent numărul complet din registru, cu indicele prelevatului (A,B). Scrie numărul pe spatele tubului sau în partea de sus a lui.
Transferul sputei/produsu lui în tubul pt decontaminare	Cantitate insuficientă	Selectează fragmentele purulente din spută, cu evitarea părții salivare. Prelucează minim 2 ml de spută. Lucrează cu calm și atenție.
Decontaminare	Proporție neadecvată între produs și substanța folosită pt. decontaminare. Concentrație greșită a decontaminantului. Decontaminant nesteril. Agitare insuficientă, sau prea energică. Folosirea de soluții reci (neechilibrate termic înainte de folosire)	Respectă rețeta de preparare și condițiile de lucru. Verifică data preparării soluțiilor și folosește-le în termenul de valabilitate. Folosește reactivi cu calitate și puritate verificate. Instruirea și supravegherea personalului. Etalonare echipamente. Folosește materiale de unică folosință sterile. Dacă se dorește o decontaminare mai agresivă poți crește cantitatea de decontaminant de până la de 2 ori mai mult decât sputa, dar nu prelungi timpul de contact peste 20 de minute. Lucrează cu calm și atenție.
Neutralizare	Concentrație sau cantitate neadecvată a substanței neutralizante	Instruirea și supravegherea personalului. Etalonare balanță, greutăți, cilindri, pipete. Folosește materiale consumabile sterile, de unică folosință. Respectă rețetele de preparare. Verifică data preparării soluțiilor și folosește-le în termenul de valabilitate.

Etapa	Greșeli posibile	Prevenirea greșelii
		Folosește reactivi cu certificat de calitate, cu puritate cunoscută. Nu amâna neutralizarea mai mult de 20 de minute de la contactul decontaminantului cu produsele de prelucrat. Lucrează cu calm și atenție.
Centrifugare	Forța relativă de centrifugare neadecvată. Nerespectarea timpului de centrifugare.	Folosește centrifugă cu răcire, cu forța relativă de centrifugare verificată (3000xg), 20 minute.
Însămânțare	Cantitate prea mică sau prea mare a inoculului. Contaminare.	Însămânțează cu pipete gradate. Lucrează calm, cu atenție. Folosește pipete sterile, medii verificate.
Incubare	Închiderea necorespunzătoare a flaconelor. Temperatură neadecvată, cu fluctuații.	Respectă recomandările referitoare la gradul de strângere a dopurilor pentru fiecare metodă. Etalonează termometrele și monitorizează temperaturile.
Examinarea culturilor	Necunoașterea morfologiei micobacteriilor. Nerespectarea planificării examinării/citirii culturilor	Instruirea și reinstruirea personalului.
Raportarea rezultatului	Transcrierea greșită a rezultatului în registru, în buletinul de analiză, în baza de date.	Concentrarea atenției executantului. Instruirea și reinstruirea personalului. Lucrează cu calm și atenție.

Sisteme automate de cultivare în mediul lichid

Principiu: micobacteriile consumă în timpul creșterii oxigenul dizolvat în mediul de cultură. Sistemul MGIT 960 folosește tuburi cu mediu de cultură care au la bază un buton de silicon care conține substanță fluorescentă, mascată de oxigenul dizolvat în mediu. Pe măsura consumării oxigenului în timpul creșterii bacteriene, fluorescența poate fi măsurată, iar sistemul declanșează semnalul pozitiv.

Sistemul VersaTREK monitorizează modificarea presiunii parțiale a gazelor din tubul de creștere (oxigen, azot, CO₂); consumul de oxigen determină scăderea presiunii din flacon. Figura 1 prezintă algoritmul de cultivare în mediul lichid²⁷.

Avantaj: scuratarea timpului de obținere a rezultatului pozitiv.

Dezavantaj: rată de contaminare mai mare decât pentru cultivarea în mediul solid. Necesită personal bine instruit și antrenat.

Precauții generale la folosirea sistemelor automate de cultivare

- Pentru sistemele automate de cultivare se va folosi exclusiv aplicația furnizată de producătorul echipamentului,
- Nu se fac modificări în aplicație fără acordul producătorului,
- Orice disfuncționalitate se comunică reprezentantului național al producătorului,

- Se vor respecta întocmai instrucțiunile de lucru și de întreținere furnizate de producător,
- Este obligatorie respectarea precauțiilor universale referitoare la mânăuirea probelor biologice, corespunzător clasei de risc 3,
- Nu se folosesc materiale consumabile sau reactivi cu termenul de expirare depășit.

Toate tuburile (culturile) semnalate pozitive se verifică microscopic după colorarea ZN a preparatului pentru vizualizarea BAAR, iar dacă sunt prezenți BAAR se efectuează obligatoriu testul imunocromatografic pentru identificarea micobacteriilor din complexul *M. tuberculosis*.

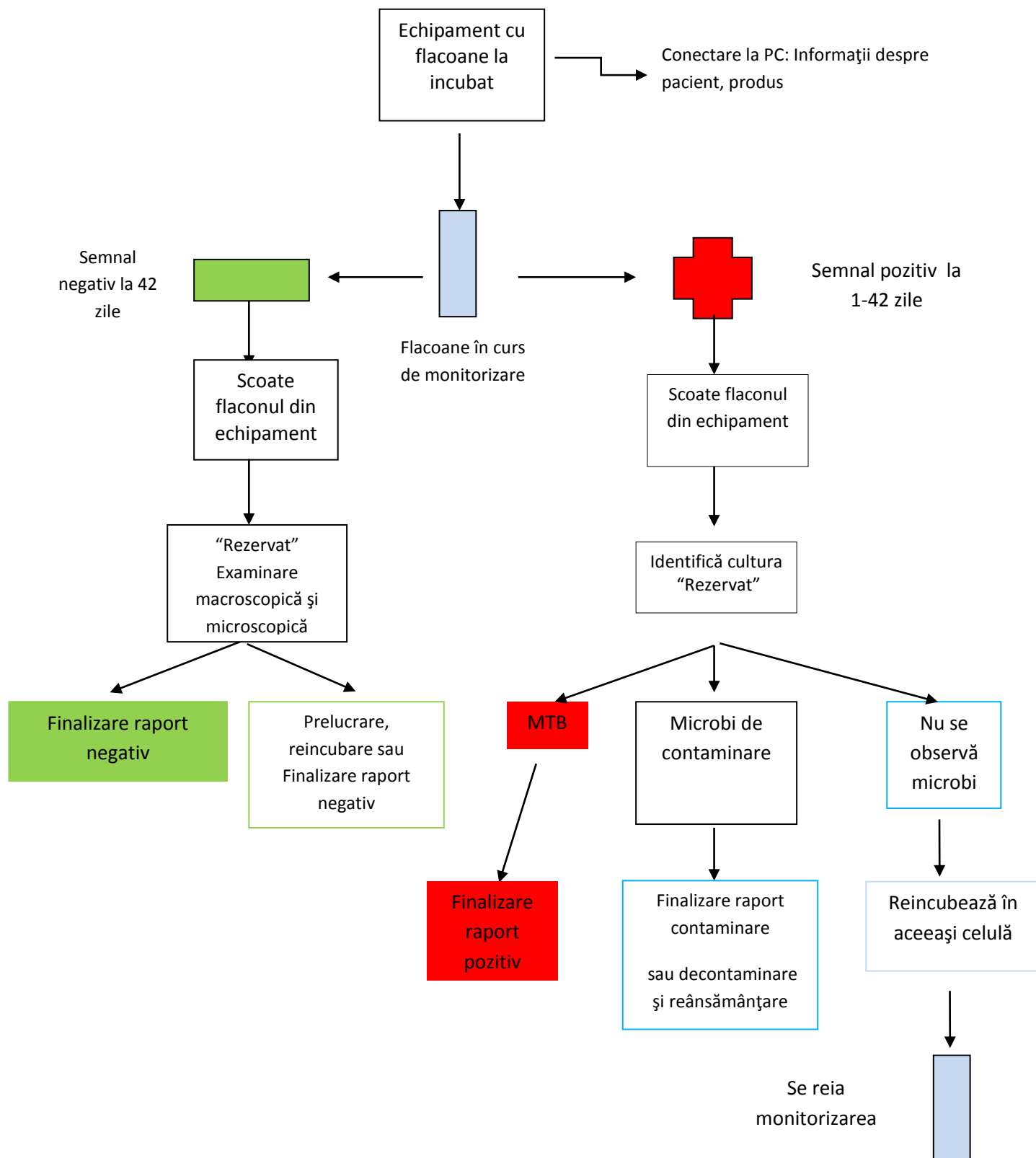


Figura 1. Algoritm de lucru pentru cultivarea în mediul lichid

“Rezervat” semnifică faptul că flaconul poate fi reintrodus în echipament, în poziția inițială.

Instrucțiune de lucru pentru folosirea sistemului automat MGIT 960¹

Produsele biologice din care pot fi cultivate micobacteriile în sistemul BACTEC MGIT 960: probe respiratorii (spută, aspirat bronșic, lavaj bronșic), aspirat gastric, și alte fluide ale corpului.

Nu se însămânțează în MGIT 960: sputa hemoptoică, sânge, măduvă osoasă, urină, fecale, țesut de biopsie.

Prelucrarea probelor biologice se face ca și pentru cultivarea în mediul solid, folosind metoda de decontaminare cu NaOH-NALC (sau Petroff, cu centrifugare).

Pregătirea și însămânțarea culturii

1. Reconstituie MGIT PANTA cu 15 ml supliment MGIT (aseptic). Amestecă până se dizolvă complet. Scrie data reconstituirii pe flacon. Este valabil 5 zile la 2-8°C.
2. Pune câte 0,8 ml din acest mediu de îmbogățire în fiecare tub MGIT numerotat/etichetat cu cod de bare specific probei pentru cultură, înaintea inoculării probei.
3. Adaugă 0,5 ml din proba prelucrată (decontaminată).
4. Strânge capacul cât mai bine și inversează-l de câteva ori pentru a omogeniza conținutul, fără să faci spumă.
5. Decontaminează tuburile pe exterior cu alcool.

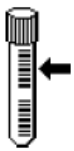
Introducerea tuburilor în aparatul MGIT:

1. Deschide sertarul dorit



2. Apasă "tub entry" (tub cu săgeata spre tub)

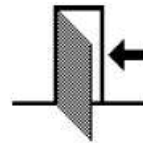
3. Scanează codul de bare al *tubului*, apoi codul de bare al *pacientului*



(semnal sonor la scanare)

4. Introdu tubul acolo unde indică led-ul verde.

5. Repetă punctele de mai sus pentru fiecare tub care trebuie introdus



6. Închide sertarul și apasă "exit" (simbol ușă), când ai terminat.

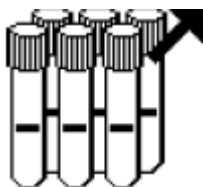
Culturile vor rămâne în echipament până când vor fi semnalate ca pozitive sau până la finalul protocolului pentru culturile negative (42 zile). Vezi algoritmul din **Fig 1**.

Dacă un tub va fi semnalat ca pozitiv dar frotiul colorat ZN este negativ pentru BAAR sau contaminanți, acesta *se poate reintroduce în aparatul MGIT cu condiția să nu fi trecut mai mult*

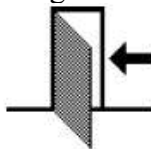
de 5 ore de la scoaterea acestuia din aparat (se scanează tubul atunci când e scos și din nou când e reintrodus iar echipamentul va recunoaște codul de bare și va continua citirea de unde a rămas anterior scoaterii din aparat, cu condiția să deschizi același sertar din care a fost scos). Dacă trec cele 5 ore se va reintroduce în aparat, dar echipamentul îl va înregistra ca probă nouă. Se poate incuba în continuare și în incubatorul obișnuit pentru culturi, la 37⁰ C, încă 24 ore, după care se repetă verificarea macroscopică și microscopică.

Scoaterea tuburilor negative (mai multe odată fără să se scaneze tub cu tub):

1. Deschide sertarul care are aprind ledul verde
2. Apasă "remove negative tubes"



3. Apasă "remove negative batch".
Se dezactivează scannerul de cod de bare și tuburile nu mai pot fi scanate individual.
4. Celulele cu tuburi negative au led verde corespundent. Scoate toate tuburile negative înainte de a închide sertarul. Dacă rămân tuburile în continuare în sertar, aparatul le va percepe ca nou introduse.
5. Când au fost scoase toate tuburile negative se aude "beep" de 3 ori, dispar led-urile verzi, scanner-ul se oprește și apare pictograma "ok". Apasă "ok"



6. Închide sertarul și apasă "exit"

Recomandată inspecția vizuală a tuturor tuburilor negative scoase iar dacă se constată turbiditate sau prezența de grunji ori flocoane se prepară un frotiu colorat ZN.

Scoaterea tuburilor negative (pe rând):

1. Deschide sertarul unde este aprins ledul verde.



2. Apasă "remove negative tubes"
3. Celulele cu tuburi negative au led verde și se activează scannerul de cod de bare.
4. Imediat ce se scoate un tub, se scanează înainte de scoaterea următorului și se stinge automat led-ul corespunzător.

Scoaterea probele pozitive:

1. Apasă "silence" pentru a dezactiva alarma
2. Deschide sertarul cu ledul roșu (+) aprins



3. Apasă ” remove positive tubes”
4. Toate tuburile pozitive vor fi indicate cu led verde (*verde în dreptul celulei și roșu pe ușă!*)
5. Scoate tub cu tub și scanează-l pe fiecare.
6. Se vor dezactiva automat led-urile verzi din sertare și cel roșu de pe mânerul ușii.
7. Când au fost scoase toate probele pozitive, aparatul va emite un semnal sonor de 3 ori.

Managementul probelor pozitive:

1. Inspectează vizual tuburile: ca orientare, cele cu creștere micobacteriană vor avea granule/grunji, iar cele cu contaminanți vor fi tulburi lăptoase.
2. Agită tubul MGIT și extrage 200 μ l (cca 4 picături), 2 picături pentru însămânțare pe mediul de cultură și 1-2 picături pentru frotiu.
3. Prepară câte un frotiu pentru fiecare cultură, astfel: pregătește o lamă pentru o cultură cu câte două spoturi și pune albumina adezivă în strat subțire, apoi, peste ea, câte o picătură din cultură, lasă la uscat pe uscătorul de lame, la 65-75⁰ C cel puțin două ore, apoi colorează ZN și examinează microscopic pentru prezența BAAR.
4. Însămânțează câte un tub cu mediul LJ pentru fiecare cultură pozitivă. Opțional, inoculează o placă cu mediu cu sânge (Agar Columbia cu sânge) pentru confirmarea prezenței contaminanților.
5. Reintrodu tubul MGIT în aparat în maxim 5 ore, dacă nu vizualizezi microbi în frotiu.
6. Incubează la 36,5- 37°C tubul cu mediul LJ și placa cu mediu geloză sânge și urmărește creșterea bacteriană, în funcție de caz (până la creștere, dar maxim 42 zile în cazurile BAAR pozitiv, sau 72 ore în cazul prezenței altor microbi în frotiu).

Citirea probelor MGIT

Un tub pozitiv este semnalat automat prin algoritmi interni când UC (unitățile de creștere) au trecut de valoarea de 75. Această valoare este identificată ca probă pozitivă și este confirmată prin teste suplimentare precum colorație ZN, identificare imunocromatografică și verificări de contaminare.

Dacă tubul este semnalat pozitiv în primele 2 zile de incubare înseamnă creștere foarte rapidă și se suspectează o contaminare. Se poate produce semnal pozitiv precoce și când pH –ul inoculului nu este cel corect.

Un tub pozitiv pe MGIT conține în mod obișnuit o biomasă de cca 10⁵ până la 10⁶ UFC/ml. Totuși, un tub poate fi semnalat pozitiv pe MGIT și atunci când numărul UFC este prea mic pentru a se putea obține frotiu pozitiv BAAR în colorația ZN.

Interpretarea rezultatelor pe MGIT:

1.

Rezultat ZN	Rezultat mediul de cultură Agar sânge	TDD (timp de detecție) MGIT
Negativ BAAR	Creștere bacteriană	Mai mult de 7 zile

Interpretare: Tubul este contaminat. Cultura MGIT contaminată. Se comunică clinicianului cultura contaminată.

2.

Rezultat ZN	Rezultat mediul de cultură Agar sânge	TDD (timp de detecție) MGIT
Negativ BAAR	Creștere bacteriană	Mai puțin de 7 zile

Interpretare/conduită: Reincubează tubul pentru încă 14 zile și repetă colorația ZN și însămânțarea pe agar sânge.

Dacă ZN este pozitiv BAAR, urmează pct 3, dacă ZN este negativ, este confirmată cultura contaminată.

3.

Rezultat ZN	Rezultat mediul de cultură Agar sânge	TDD (timp de detecție)
Pozitiv BAAR	Creștere bacteriană	Oricare

Interpretare/conduită: Prepară un frotiu colorat ZN și însămânțează pe mediul LJ pentru a verifica dacă nu este o micobacterie cu creștere rapidă ca sursă de contaminare. Se face un test rapid de identificare Ag MPT64 din tubul MGIT pentru a confirma dacă aparține complexului *M. tuberculosis*.

- **Dacă ZN din mediul de cultură este pozitiv BAAR:**
 - a. iar testul imunocromatografic este negativ, reincubează tubul MGIT pentru încă 48 ore și retestează pentru Ag MPT64.
 - b. iar testul imunocromatografic este pozitiv, se raportează proba pozitivă pentru complexul *M. tuberculosis* și contaminare.
 - c. iar Ag MPT64 este negativ se identifică genetic specia de micobacterie (MTBC, CM).
- **Dacă ZN din mediul de cultură lichid este negativ BAAR** se ia în considerare rezultatul testului Ag MPT64:
 - a. Dacă testul rapid este pozitiv, cultura este pozitivă pentru *M. tuberculosis* și contaminare. *Interpretare cu extremă prudență!*. Preferabilă așteptarea creșterii subculturii pe LJ, cu repetarea identificării.
 - b. Dacă testul rapid este negativ, se reincubează și se retestează ca mai sus (a).

4.

Rezultat ZN	Rezultat mediul de cultură Agar sânge	TDD (timp de detecție)
Pozitiv BAAR	Fără creștere	Oricare

Interpretare/conduită: Testează pentru Ag MPT64 pentru confirmarea MT.

- a. Dacă este confirmat *complex M. tuberculosis*, raportează rezultatul ca atare.
- b. Dacă testul este negativ sau invalid, reincubează proba pentru încă 48 ore și retestează pentru Ag MPT64.
 - Dacă acum testul rapid este pozitiv se raportează *complex M. tuberculosis*. Dacă este în continuare negativ, se continuă pentru identificare genetică a speciei.

5.

Rezultat ZN	Rezultat mediul de cultură Agar sânge	TDD (timp de detecție)
Negativ BAAR	Fără creștere	Oricare

Interpretare/conduită: Deși rară, această situație poate să apară și necesită investigații suplimentare. Reincubează tubul pentru încă minim 3 zile sau până când este semnalat din nou pozitiv. Repetă ZN și cultura pe mediul agar sânge.

- Dacă ZN este pozitiv și cultura pe mediul agar sânge negativ, procedează ca la pct. 4.
- Dacă ZN este pozitiv și cultura pe mediul agar sânge denotă contaminare, procedează ca la pct.3.
- Dacă ZN este negativ și cultura pe mediul agar sânge denotă contaminare, procedează ca la pct.2.
- Dacă ZN este negativ și cultura pe mediul agar sânge este fără creștere, reincubează tubul MGIT până la finalul protocolului de 42 zile. Dacă este semnalat din nou pozitiv, repetă ZN și cultura pe mediul agar sânge.

Decontaminarea tuburilor MGIT contaminate:

Se aplică în următoarele situații

- Probă pozitivă pentru complex *M. tuberculosis* și contaminare.
- Probă unică care nu se poate repeta (aspirat bronșic, gastric, LCR etc.)
- a. Vortexează tubul MGIT contaminat
- b. Transferă aseptice întregul volum de mediu într-un tub de centrifugă de 50 ml
- c. Adaugă o cantitate egală de MycoPrep sau NaOH 4% (vezi decontaminarea).
- d. Amestecă bine și lasă în repaus 15-20 min (periodic se inversează tubul)
- e. Adaugă tampon fosfat pH 6.8 până la marcajul de 50 ml și omogenizează bine; sau neutralizează cu HCl 8%, apoi adaugă SFS până la 50 ml.
- f. Centrifugează (centrifuga cu răcire) la 3000xg pentru 20 minute
- g. Îndepărtează supernatantul.
- h. Resuspendă sedimentul în 0.5 ml tampon fosfat sau SFS și agită bine.
- i. Inoculează 0.5 ml într-un tub nou MGIT care deja conține suplimentul nutritiv și PANTA.

Instrucțiune de lucru pentru folosirea sistemului VersaTREK

Produsele biologice din care pot fi cultivate micobacteriile în sistemul VersaTREK: probe respiratorii (spută, aspirat bronșic, lavaj bronșic), aspirat gastric, sânge, măduvă osoasă și alte fluide ale corpului, urină, fecale, țesut de biopsie.

Prelucrarea probelor biologice, altele decât sângele sau măduva osoasă, se face ca și pentru cultivarea în mediul solid, folosind metoda de decontaminare cu NaOH-NALC sau Petroff.

Probele de **sânge și măduvă osoasă** trebuie să fie prelucrate prin una din următoarele metode înainte de inocularea flacoanelor VersaTREK Myco (VTM):

- Tuburi izolatoare: Urmează instrucțiunile producătorului tuburilor izolatoare pentru liză și concentrare. Inoculează 1 ml de sediment în flaconul (VTM).
- Liza celulelor sanguine integrale cu ADS:

- Recoltează 5-10 ml de sânge integral într-o eprubetă Vacutainer care conține polianetol-sulfonat de sodiu (SPS) sau heparină (eșantion minim de cel puțin 5 ml).
- Răstoarnă tubul de mai multe ori, fără agitare.
- Transferă steril tot conținutul într-o eprubetă conică de 50 ml (tub Falcon) pentru centrifugă.
- Adăugă ADS până la marcajul de 40 ml de pe eprubetă. Se vor liza celulele.
- Centrifughează la 3000 x g timp de 20 de minute, temperatură 4-12 °C.
- Decantează supranatantul.
- Adăugă 1-2 ml de tampon fosfat la sediment și resuspendă-l.
- Însămânțează 1 ml din proba rezultată în flaconului VTM pregătit.

Însămânțarea flacoanelor de cultură VersaTREK Myco²⁷

1. Dezinfectează dopul flaconului VTM AS (sau îndepărtează-l cu atenție).
2. Reconstitue aseptice VTM AS injectând 25 ml de ADS prin septul dezinfectat folosind ac și seringă (*sau pipetează aseptice ADS*). Va fi suficient reactiv pentru 50 de flacoane.
3. Scrie data reconstituirii pe flacon. Poate fi folosit 5 zile cu păstrare la frigider, sau 3 luni prin congelare la -20° C (scrie data reconstituirii și a expirării, pentru că termenul de păstrare trebuie să se încadreze în termenul de valabilitate menționat pe flaconul original). Dacă nu folosești în 5 zile, repartizează pentru 5-10 culturi în tuburi pentru că odată decongelat nu se recongelează.
4. Etichetează flaconul de cultură VTM cu informațiile pacientului.
5. Dezinfectează dopul flaconului VTM cu alcool. Așteaptă să se evapore.
6. Adăugă aseptice **1 ml de VTM GS** (supliment de creștere) injectând prin dop cu o seringă cu ac, sau deșurubează dopul și pipetează aseptice, apoi strânge dopul.
7. Adăugă aseptice **0.5 ml de soluție VTM AS** (supliment antibiotic) prin injecție prin membrana cauciucată cu o seringă cu ac, sau deșurubează dopul și pipetează aseptice, apoi strânge dopul.
8. Însămânțează **cel mult 1 ml de probă clinică decontaminată**, concentrată, cu o seringă cu ac, sau cu pipetă. Strânge bine dopul și amestecă prin inversarea flaconului de 5-6 ori, fără agitare.

Însămânțează suplimentar 0.1 ml de probă pe o placă de agar - sânge pentru aprecierea decontaminării în cadrul CIC, pentru probe selectate randomizat.

- **Supraumplerea semnificativă a flaconului poate cauza rezultate fals pozitive, iar în cazul probelor de sânge prelucrate cu tuburi izolatoare este posibilă inhibarea creșterii micobacteriilor.**
- ***Alternativ, etapele 2 și 6-8 pentru pot fi efectuate prin deschiderea flacoanelor și adăugarea de reactivi și probe cu ajutorul pipetelor sterile. Trebuie avut grijă să se mențină tehnologia aseptice. Membrana cauciucată și capacul trebuie să fie înșurubate bine pentru a garanta închiderea etanșă. Dacă membrana cauciucată și capacul nu sunt așezate corespunzător, se va produce eroare de scurgere a flaconului.***

9. Dezinfectează flaconul de cultură și gâtul lui cu dezinfectant micobactericid (alcool).
10. Îndepărtează sigiliul din partea de jos a unui conector VT. Așează capătul conectorului cu ac pe gâtul flaconului de cultură și apasă-l în jos pe verticală pentru a puncta membrana cauciucată a flaconului de cultură.

Nu mai este permisă răsturnarea flaconului de cultură după montarea conectorului VT pe el. Lichidul din ac poate interfera cu citirile de presiune pentru flacon.

11. Înregistrează informațiile despre pacient în calculatorul VersaTREK/ESP Culture System II.
12. Scanează codul de bare al flaconului și așează-l cu conectorul VT într-o poziție liberă din instrument, pentru incubare, prin apăsare. Rotește conectorul după poziționare corectă.
13. Când instrumentul indică cu led roșu constant că o anumită locație de flacon conține cultură pozitivă, îndepărtează flaconul și urmează algoritmul de identificare (fig 1).
14. Lucrează în CPM. Scoate conectorul VT din flacon și îndepărtați-l în recipientul pentru deșeuri infecțioase tăietoare-înțepătoare. Dezinfectează dopul de cauciuc cu alcool.
15. Agită flaconul temeinic cu vortexul sau manual pentru a disloca organismele din materia spongioasă conținută în flacon.
16. Urmează algoritmul de identificare: frotiu ZN, test imunocromatografic, subcultură LJ:
 - Dacă sunt prezenți BAAR pe frotiu, continuă identificarea cu testul imunocromatografic AgMPT64.
 - Pe frotiu nu se vizualizează microbi, atașează un nou conector VT, reintrodu flaconul în instrument, în aceeași poziție și continuă incubarea.
 - Pe frotiu sunt organisme non-acido-rezistente, conținutul flaconului poate fi decontaminat (vezi la MGIT) și inoculat într-un nou flacon VTM, sau poate fi considerat deșeu infecțios și se prelucurează un alt produs. Rezultatul va fi cultură contaminată.
17. La finalul perioadei de incubare (42 de zile), un flacon care nu a prezentat răspuns pozitiv de creștere bacteriană trebuie să fie inspectat vizual pentru a vedea dacă este tulbure sau are grunji. Dacă lichidul este tulbure sau cu grunji ori flocoane prepară un frotiu și colorează ZN, însămânțează pe agar-sânge și LJ. Dacă mediul este limpede, flaconul poate fi debarasat/ autoclavat. Rezultat: cultură negativă.

REZULTATE

Semnal pozitiv:

- *Cu identificare de microbi din **complexul M. tuberculosis***: Există aproximativ 10^6 unități formatoare de colonii (UFC)/ml de micobacterii la momentul de detecție.
- *BAAR prezenți, dar nu este identificat complexul M. tuberculosis*. Subcultură și identificare genetică a NTM în LNR. Rezultat: **M. spp**, cultură în curs de identificare la LNR.
- **Cultură contaminată**: sunt prezenți microbi de contaminare.

Semnal negativ: la sfârșitul perioadei de incubare.

Adăugarea informațiilor pacientului DUPĂ scanarea flaconului

1. La computer, selectează pictograma de căutare (lupa)
2. FILTER (Filtrare)
3. PENDING (Așteaptă)
4. ALL IN THE INSTRUMENT (Introdu toate flacoanele în instrument)
5. SPLIT (Împărțire ecran - se poate să fie deja împărțit)
6. Fă click pe bara colorată albastru din partea de sus a ecranului, de căutare, pentru a deschide un tabel, dacă acesta nu este deja deschis.



7. Introdu codul de acces în câmpul *Accession Id* din tabel (numărul din registru).
8. Fă click pe primul raport din partea stângă a ecranului.
9. Introdu numele și CNP pacient, împreună cu alte detalii.

Pentru înregistrări multiple: dă click pe *următorul (next)*, (jos, în partea stângă a ecranului, pentru a salva informațiile înregistrate anterior.

Pentru o singură înregistrare: selectează și dă click pe butonul **REFRESH** (reîncărcare pagină).

Introducerea informațiilor pacientului ÎNAINTE de scanarea unui flacon



1. **La computer**, selectează pictograma pentru **introducere probă**
2. **NEW** (Nou)
3. Introdu codul ID de acces (numărul din registru)
4. Selectează tipul testului (Myco)
5. Mergi la câmpul ID pacient
6. Scrie CNP-ul pacientului
7. Scrie numele pacientului
8. Scrie alte detalii necesare (produs, cine solicită, unitate sanitară)
9. Selectează **NEW** (Nou) din nou, pentru adăugarea datelor pentru următorul pacient și repetă pașii de mai sus.

SAU

Dacă ai terminat de introdus informațiile, închide fereastra pentru a salva modificările făcute.

ERORI POSIBILE ȘI SOLUȚII PENTRU CORECTARE

Ca pentru orice metodă folosită, în timpul funcționării echipamentului VersaTREK pot să apară probleme care ar putea conduce la rezultate cu calitate slabă.

Verifică și remediază problemele imediat ce survin. Sursele problemelor pot fi asociate cu componente hardware, temperatură, sertare sau flacoane. *Semnalele de atenționare pot fi acustice sau vizuale.* Erorile constituie surse de risc pentru calitate și trebuie să fie cunoscute de personalul care lucrează cu echipamentul VersaTREK pentru a le preveni, sau dacă ele au apărut, pentru a le recunoaște și corecta imediat.

Sunt prezentate în continuare succint, problemele care pot să apară, cauzele și modul de rezolvare a lor.

a. Probleme întâlnite la flacoanele VersaTREK

Problemă	Cauză posibilă	Soluție
În flacon este prea mult sânge (sau fluid corporal)	Flaconul nu a fost umplut corespunzător de către utilizator	Rezultatul poate fi fals-pozitiv. Confirmă rezultatul pozitiv prin examinarea frotiului ZN și a subculturii. Respectă protocolul de lucru și introdu în flacon cantitățile corecte pentru fiecare componentă necesară.

Problemă	Cauză posibilă	Soluție
Flaconul figurează activ în sistem, după înlăturarea lui din echipament	Defecțiuni de ordin hardware sau la întrerupător	Apasă butonul întrerupător; urmărește pe ecran dacă flaconul dispăre. Dacă nu obții nici un rezultat, contactează reprezentantul tehnic.
Apar erori repetate pentru același locaș	Conectare incorectă la senzor, de la întrerupător sau conexiune internă.	Printează graficul pentru locașul respectiv; anunță reprezentantul tehnic. Dezactivează locașul.
Locația flacoanelor nu coincide cu locația testului.	Flaconul VTM nu are garnitură de etanșare.	Pune garnitura de etanșare în locașul respectiv.
	Arcul este blocat sau nu se află la nivelul adaptorului.	Apasă adaptorul și arcul pentru a le aduce la același nivel.
	Este utilizat alt tip de flacon decât cel autorizat.	Folosește flacoane VT. Anunță medicul; înșămânțează altă probă în flacon nou VTM și încubează separat flaconul neacceptat sau incompatibil

b. Probleme la citirea codurilor de bare

Factori ce pot afecta scanarea	Soluții
Etichetă aplicată peste codul de bare al flaconului.	Dacă găsești un flacon al cărui cod de bare a fost acoperit sau distrus, folosește un alt flacon de același tip, din același lot, pentru scanare. Folosește eticheta unică a flaconului original pentru codul de acces.
Flaconul poate fi prea aproape sau prea departe de lentila de citire.	Ține flacoanele cu etichete mici aproape de lentila de citire, iar cele cu etichete mai mari la 1-2 cm de lentilă.
Calitatea codului de bare de pe etichetă poate fi slabă.	Verifică dungile negre care formează codul de bare să nu aibă întreruperi sau imperfecțiuni. Verifică imprimanta pentru coduri de bare dacă printează corespunzător.
Eticheta cu codul de bare trece prea rapid prin fața lentilei laser.	Laserul de citire funcționează cel mai bine dacă eticheta este ținută staționar în fața acestuia.
Lentila de citire poate fi murdară.	Praful și murdăria de pe mânușile din latex pot obtura parțial lentila de citire. Curăță lentila folosind numai produse de curățare corespunzătoare (lavetă din silicon). Nu se folosesc șervetele de hârtie sau șervețele umede pentru curățarea lentilei.
Laserul nu poate citi codul de bare întreg.	Laserul citește pe linie verticală, de sus în jos. Ține flaconul în așa fel încât eticheta să poată fi încadrată pe toată suprafața ei de raza laserului.

c. Probleme de alimentare cu energie.

Cauze posibile	Acțiuni corective
Cablul de alimentare nu este conectat.	Conectează la o priză cu împământare.
Siguranța circuitului principal este ridicată (deconectată).	Îndepărtează panoul de protecție; resetează siguranța. <i>Clapeta siguranței are inscripția On/Off pe partea dreaptă.</i> Dacă siguranța sare din nou, apelează la reprezentantul tehnic TREK.
Siguranța circuitului de alimentare electrică a clădirii este ridicată.	Contactează personalul de la serviciul tehnic al spitalului.

d. Probleme la tastatură (tastatura nu funcționează).

Cauze posibile	Acțiuni corective
Cablul de rețea nu este conectat la computer.	Oprește alimentarea, reconectează cablul, reia alimentarea.
Computerul este defect.	Apelează la reprezentantul tehnic TREK.
Tastatura este defectă.	
În tastatură sunt blocate obiecte străine (agrafe de hârtie, etc.)	Întoarce tastatura și bate ușor pe spatele acesteia sau aspiră ușor pentru a înlătura obiectele străine.

e. Monitorul / ecranul tactil nu funcționează.

Cauze posibile	Acțiuni corective
Pană de curent electric.	Apasă întrerupătorul pe poziția ON.
Cablul nu este conectat la sursa de alimentare.	Reconectează cablul.
Contrastul/ luminozitatea au un nivel scăzut.	Ajustează opțiunile de contrast/ strălucire.
Cablul nu este conectat la PC	Reconectează cablul.
Imaginea nu este calibrată.	Calibreză imaginea.
Monitorul este defect.	Apelează la reprezentantul tehnic TREK

f. Mouse-ul nu funcționează.

Cauze posibile	Acțiuni corective
Cursorul se află în afara imaginii.	Mișcă mouse-ul pentru a readuce cursorul în câmpul vizual.
Cablul mouse-ului nu este conectat la computer.	Oprește PC-ul, reconectează cablul, repornește computerul.
Mouse-ul nu este compatibil cu PC	Utilizează dispozitivul recomandat de TREK.
Mouse-ul este defect.	Apelează la reprezentantul tehnic TREK.

g. Imprimanta nu funcționează.

Cauze posibile	Acțiuni corective
Imprimanta nu este pornită.	Pornește imprimanta.
Cablul nu este conectat la imprimantă.	Reconectează cablul.
Cablul nu este conectat la PC	Reconectează cablul la PC.
Imprimanta nu are hârtie.	Realimentează cu hârtie.

Imprimanta este defectă.	Apelează la reprezentantul tehnic TREK
Imprimanta nu este configurată ca imprimantă principală.	

h. Probleme legate de temperatura VersaTREK

Problemă	Cauză posibilă	Soluție
Este declanșată alarma pentru temperatură	Temperatura în laborator este prea mare	Verifică termostatul încăperii. Resetează-l dacă trebuie.
	Punctul de încălzire este ales greșit sau calibrarea este incorectă.	Apelează la reprezentantul tehnic TREK
	Temperatura sistemului este prea mare.	
	Defecțiuni ale sistemului de alarmă.	Apasă butonul reset al alarmei. Dacă sună iar, apelează la reprezentantul tehnic TREK
	Ventilatoarele nu funcționează	Apelează la reprezentantul tehnic TREK
Semnalul luminos pentru temperatură are culoarea chihlimbarului	Temperatura în laborator este prea mare.	Verifică termostatul. Resetați-l dacă este necesar.
	Punctul de încălzire ales este greșit sau calibrarea este incorectă.	Apelează departamentul tehnic TREK.
	Temperatura sistemului este prea înaltă.	
	Sistem de alarmă defect.	Apasă butonul reset al alarmei. Dacă alarma sună din nou, apelează departamentul de suport tehnic TREK.
	Ventilatoarele nu funcționează.	Apelează departamentul tehnic TREK.
Ecranul de control pentru temperatură afișează valoare scăzută în interiorul echipamentului.	Sertar(e) deschise.	Închide sertar(e).
	Punctul de încălzire este prea mic.	Apelează departamentul tehnic TREK.
	Garnitura de izolare este crăpată/ nu izolează ermetic.	
	Defect placă AT.	
Alarma pentru temperatură nu se aude când comutatorul audio este pe poziție deschis.	Temperatura este adecvată.	Nici o acțiune.
	Defecțiune alarmă acustică.	Apelează departamentul tehnic TREK.

i. Erori de sistem VersaTREK

Problemă	Cauze posibile	Acțiuni corective
Sertar deschis, lumină LED nefuncțională	LED ars.	Apelează departamentul tehnic TREK.
	Defecțiuni ale circuitului electric.	
	Înterupătorul magnetic este îndoit sau rupt.	
	Senzorul de activare pentru sertar nu este aliniat corespunzător.	
Lumină LED activată când sertarul pare să fie închis	Obiect care împiedică închiderea sertarului.	Inspectați ușa și garnitura pentru a îndepărta orice fel de obiect străin.
	LED-ul indicator nu funcționează.	Apelează departamentul tehnic TREK.
	Senzorul de activare pentru sertar nu este aliniat corespunzător.	

j. Erori la sertare

Problema	Cauze posibile	Acțiuni corectoare
Sertarele nu pot fi închise	Șinele sertarului sunt îndoite.	Apelează departamentul tehnic TREK.
	În spatele sertarului se află obiecte străine.	
	Sertarul nu a fost reintrodus adecvat, după înlăturarea lui din echipament.	
	Mecanismul de blocare a fost re poziționat greșit, după înlăturarea sertarului din echipament.	
Sertarele nu pot fi deschise	Șinele sertarului sunt îndoite.	Apelează departamentul tehnic TREK.
	Șinele nu sunt aliniate.	
	În spatele sertarului se află obiecte străine	
Sertarele nu rămân deschise	În spatele sertarului se află obiecte străine.	Apelează departamentul tehnic TREK.
	Garnitura de etanșare lipsește sau este deteriorată.	
	Sertarul nu este aliniat la unitate.	
Curge lichid în sertare	Flacoane sparte sau crăpate.	Atenție! Aplică măsuri de protecție adecvate: mănuși, mască FFP2, ochelari de protecție. Adună cioburile, curăță și dezinfectează suprafețele afectate. Apelează departamentul tehnic TREK pentru scurgeri semnificative.
	Aerosoli produși de flacoane.	Folosește măsuri de protecție adecvate (halat, mască, mănuși)! Curăță și

Problema	Cauze posibile	Acțiuni corectoare
		dezinfectează suprafețele afectate. Schimbă tamponul de absorbție.
Senzorul sau întrerupătorul sunt defecte	Senzorul sau întrerupătorul sunt defecte.	Dezactivează locașul și apelează departamentul tehnic TREK..

k. Semnale luminoase

Problemă	Cauze posibile	Acțiuni corective
Luminile LED pentru locașuri continuă să clipească și după ce flacoanele au fost introduse	Flacoanele nu au fost introduse corespunzător în locașuri.	Înlătură flaconul; atașează conectorul VersaTREK. Repetă procesul de încărcare pentru flacoane. Aliniază conectorul VersaTREK la senzor.
	LED-urile nu funcționează.	Apelează departamentul tehnic TREK.
	Senzorul pentru flacoane nu funcționează.	
Unul sau mai multe LED-uri sunt aprinse în mod constant: lumină continuă sau intermitentă	Flacon pozitiv.	Procesează flaconul pozitiv.
	Senzor flacon blocat.	Apasă întrerupătorul pentru ca lumina să dispară. Dacă semnalul luminos persistă, apelează departamentul tehnic TREK.
	Eroare de motor, convertor sau EEPROM.	Verifică detaliile locașului și tipul de avarie. Dezactivează locașul.
	LED defect.	Apelează departamentul tehnic TREK.
LED-urile nu emit semnale luminoase pentru introducere/înlăturare flacon după câteva încercări repetate.	LED-uri defecte.	Apelează departamentul tehnic TREK.
	Eroare de conexiune.	
Luminile pentru status unitate nu funcționează atunci când LED-ul roșu pentru sertar este activ.	În sistem nu se află nici un flacon pozitiv.	Verifică inventarul flacoanelor din sistem.
	Conexiunea/ comunicarea dintre sertar și placa centrală este defectuoasă.	Apelează departamentul tehnic TREK.
Pictograma pentru <i>Introducere flacon</i> nu activează cititorul pentru coduri de bare.	Cititorul pentru coduri de bare nu funcționează.	
	Ecranul LCD este defect.	

Identificarea culturilor

Fie că sunt culturi pe mediul LJ, pentru care citirea se face manual, fie că sunt culturi în mediul lichid obținute prin cultivare în sisteme cu semnalare automată a pozitivării, finalizarea rezultatului este posibilă doar după parcurgerea etapelor de identificare a microbilor crescuți²⁶:

- Examinare macroscopică (aspectul coloniilor, culoarea/aspectul mediului)
- Examinarea microscopică în colorația ZN.
- Test imunocromatografic rapid Ag MPT64, dacă pe frotiul colorat ZN sunt prezenți BAAR.

Morfologia macroscopică a coloniilor

În funcție de compoziția mediului de cultură, morfologia macroscopică a coloniilor de micobacterii din complexul *M. tuberculosis* poate varia, de aceea vom descrie mai jos aspectul orientativ pe care îl putem vedea cel mai des pe mediile folosite în țara noastră, la examinarea cu ochiul liber sau/și cu lupa:

Morfologia macroscopică a coloniilor pe mediul LJ care conține glicerol^{4,18,22}

- colonii rugoase (R), de 1-4 mm diametru, crem-gălbui conopidiforme, uscate, cu margini bine definite, crenelate, ușor bombate sau uneori plate (*M. tuberculosis*). Coloniile tinere, pe mediu bine hidratat pot fi netede, bombate.
- colonii netede (S), de 1-2 mm diametru, alb-gălbui (*M. bovis*)
- culoarea mediului nu este modificată sau cel mult pare discret decolorat.
- dacă mediul este intens decolorat sau verde-albăstrui se va suspecta contaminare cu alți microbi; se face totuși frotiu pentru verificare. Nu se face frotiu dacă mediul este lichefiat.

Morfologia macroscopică a coloniilor crescute în mediul lichid Middlebrook 7H9.

- mediul rămâne limpede și are un depozit fin la fundul tubului; după agitarea tubului lichidul are suspensii granulare de dimensiuni diferite.
- mediul este tulbure uniform sau se tulbură după agitare.

Morfologia microscopică a coloniilor^{3,4}:

- La prepararea frotiurilor se apreciază modul de emulsionare; grunjoasă-poate sugera MT; uniformă-poate sugera NTM sau alți microbi.
- colorează ZN și examinează la microscopul optic
- descrie în caietul de lucru:
 - *așezarea în frotiu*: corzi-serpentine, cu număr mic de BAAR izolați (PC = pozitiv corzi); grămezi de bacili, respectiv bacili aglomerați în mai multe zone, fără să se poată vedea continuitatea corzilor, cu puțini BAAR izolați (PG = pozitiv grămezi); BAAR distribuiți nesistematizat, uniform (PN = BAAR pozitiv, nesistematizați); prezența de corzi laxi.
 - *lungimea bacililor*: bacili mai lungi de 7 μm. Verifică dacă sunt și bacili ramificați; bacili cu lungimea între 3-6 μm; bacili de 2 μm sau forme cocoide.
 - *tinctorialitatea bacililor*: BAAR colorați uniform; BAAR colorați granular; BAAR incomplet colorați, albaștri, cianofili.
 - Prezența altor microbi, singuri sau în asociere cu BAAR.

Înregistrarea/Raportarea rezultatelor

Rezultatul examinării microscopice efectuate pentru verificarea/identificarea culturii rămâne înregistrat doar în documentele laboratorului.

În registrul laboratorului și în buletinul eliberat către clinician va figura doar diagnosticul final, după caz: complex *M. tuberculosis*, sau NTM (micobacterii netuberculoase), cultură contaminată.

În cazul culturilor din mediul lichid, pentru creșterea aderenței microbilor la lamă se folosește albumină adezivă¹, care ajută la fixarea preparatelor lichidiene cu celularitate săracă, pe lamă.

Aplică pe lamă o peliculă foarte fină din unul din preparatele de mai jos. Pelicula groasă împiedică uscarea și favorizează desprinderea preparatului de pe lamă.

a. Albumina glicerinată Mayer²⁸

- 50 ml albuș de ou (de la 2 ouă)
- 50 ml glicerină anhidră
- 1 g salicilat de sodiu umectat cu ADS

Amestecă prin mișcări circulare, aseptice, într-un balon steril cu perle de sticlă.

Filtrează prin hârtie de filtru sterilă. Rezultă un lichid translucid, slab gălbui, limpede.

Verifică sterilitatea. Păstrează la temperatura camerei 2 - 6 luni. Lucrează steril, cu pipetă sau tampon.

b. Albuș de ou acetic

- 1 albuș de ou agitat energic, fără să spumeze, câteva minute, prin mișcări circulare cu
- 80 ml ADS
- adaugă apoi 3 ml acid acetic.
- filtrează prin hârtie de filtru sterilă.

Verifică pentru sterilitate. Conservare indefinită, la temperatura camerei. Lucrează steril, cu pipetă sau tampon.

Etaple examenului microscopic pentru examinarea culturilor pozitive sunt descrise mai sus la "Examenul microscopic", colorația ZN.

Prepararea frotiurilor.

a. Cultură pe mediul LJ

1. marchează lama cu numărul culturii
2. pune o picătură de apă distilată sau albumină adezivă pe lamă folosind pipetă
3. ia cu ansa bacteriologică din 2-3 colonii și amestecă blând în lichidul de pe lamă, fără să stropești
4. usucă la aer, pe plită cu termostatare (65-70°C) și așteaptă cel puțin 2 ore înainte de etapa următoare

b. Cultură din mediul lichid Middlebrook 7H9

1. marchează lama cu numărul culturii
2. agită tubul cu cultură manual sau prin vortexare. Așteaptă 5 minute să sedimenteze aerosolii infecțioși.
3. pune o picătură de albumină adezivă pe lama folosind pipetă

4. ia cu pipeta cca 100 µl din cultură și amestecă blând în albumina adezivă depusă pe lamă, fără barbotare.
5. usucă la aer, pe plita cu termostatare (65-75°C) și așteaptă cel puțin 2 ore înainte de etapa următoare.

Colorarea frotiurilor. Colorația Ziehl Neelsen¹⁶

1. pune lamele cu frotiurile fixate pe suportul de colorare fără să se atingă între ele.
2. acoperă complet frotiurile cu soluție 0.3% de fuchsină fenicată proaspăt filtrată.
3. treci pe sub frotiuri flacăra unui bec de gaz până la emiterea de vapori, fără să fiarbă. Repetă acțiunea de 3-4 ori în primele 3 minute. Completează cu fuchsină dacă aceasta s-a uscat sau s-a scurs de pe lamă. Lasă până la 10 minute.
4. spală cu jet slab de apă de robinet și scurge apa.
5. acoperă frotiul cu alcool-acidulat 3% și lasă-l pentru decolorare maxim 3 min. Nu insista cu decolorarea dacă preparatul este efectuat din cultură (în peste 90 % din aceste preparate sunt prezenți BAAR, care nu se vor decolora)
6. spală din nou cu jet slab de apă de robinet și scurge apa.
7. acoperă frotiul cu albastru de metilen 0,3% timp de 30 sec., maximum 1 minut.
8. spală blând sub jet de apă de robinet.
9. Usucă la aer, fără să forțezi uscarea.

Frotiurile din culturi se colorează exclusiv ZN. Culturile pentru care frotiul indică prezența BAAR se testează obligatoriu pentru confirmarea apartenenței la complexul *M. tuberculosis*, folosind test rapid imunocromatografic Ag MPT64.

Culturile cu rezultat negativ Ag MPT64 se trimit imediat la LNR pentru identificare de specie.

- Indiferent de metoda de preparare a frotiurilor, ele trebuie lăsate să se usuce la aer, ferite de raze UV, pe plita cu termostatare din interiorul CPM, de unde sunt scoase pentru colorare.
- Toate materialele folosite (pipete, anse, tuburi) se colectează în recipiente pentru materiale infecțioase și se autoclavează.
- După colorare usucă frotiurile în poziție înclinată pe suport de lame la temperatura camerei.
- Nu încălzi lamele pentru grăbirea uscării pentru că frotiul se poate crăpa și se dezlipește de pe lamă.
- La prepararea frotiurilor din culturi se pot genera o cantitate mare de aerosoli infecțioși.
- Se respectă obligatoriu precauțiile de prevenire a generării și răspândirii aerosolilor infecțioși.
- Chiar dacă se prepară mai multe spoturi pe aceeași lamă, acestea trebuie să fie din aceeași cultură, nu din culturi diferite, pentru a nu se contamina încrucișat în etapele de colorare, prin prelingere de pe un spot pe altul, cu rezultat fals pozitiv.

Testul imunocromatografic pentru identificarea complexului *M.tuberculosis* în cultură

Principiul testului

Caracterizarea biochimică, imunologică și moleculară a MTB a dus la evidențierea mai multor antigene utile în identificarea bacteriilor aparținând complexului *M. tuberculosis*.^{1,29,30}

Testul de identificare a Ag MPT64, pus în evidență în lichidul culturilor bacteriene de MTB, folosește anticorpi monoclonali anti-MPT64 proveniți de la șoareci, în test de tip sandwich.

Descrierea testului

- Testul conține un godeu pentru probă și o porțiune absorbantă cu liniile **T** = test și **C** = control
- Linia control se folosește pentru validarea reacției, fiind colorată în roșu doar dacă tehnica a fost corect aplicată și reactanții sunt funcționali
- Linia test se colorează în roșu în cazul prezenței de Ag MPT64 în suspensia bacteriană

Păstrare

- La temperatura camerei, între 1-30 °C (nu se congelează)
- Nu se ține la lumină directă, este sensibil la căldură și umiditate
- Testul se va folosi imediat după scoaterea din pachet
- Nu se va utiliza după expirarea valabilității

Prepararea suspensiei bacteriene

- Culturile în mediu **lichid** pot fi folosite ca atare, depunând 100 μl în godeul pentru probă
- Culturile în mediu **solid** se prepară astfel: se suspendă 3-4 colonii în 200 μl soluție de extracție; dacă există lichid de condens la baza pantei mediului solid, se folosesc 100 microlitri din acesta.

Procedura de lucru

- Se scoate caseta din pachet și se așează pe o suprafață netedă, uscată
- Se marchează cu numărul culturii de cercetat
- Se depun 100 μl (mediu lichid sau suspensie bacteriană în soluția de extracție) în godeul pentru probă
- Se urmărește colorarea în roșu-violet a benzilor test și control pe măsura absorbției probei
- Interpretarea rezultatului are loc la 15 minute de la depunerea probei

Rezultat negativ : se colorează doar linia control C. Pot fi NTM (dacă frotiul colorat ZN arată prezența de BAAR) sau microbi de contaminare (colorați albastru).

Rezultat pozitiv : complexul *M. tuberculosis*, se colorează ambele linii, test T și control C.

Test invalid, neinterpretabil: nu se colorează linia C. Necesită repetare pe o altă casetă.

Înregistrări

Rezultatele testului se înregistrează în caietul de lucru pentru identificare. În registrul laboratorului și în buletinul de rezultate se scrie doar rezultatul final, concluzia: MTB sau NTM, sau/și cultură în curs de identificare, dacă cultura a fost trimisă la LNR pentru identificare de specie în cazul rezultatului negativ la cultura cu frotiu BAAR pozitiv la verificarea microscopică, ori cultură contaminată.

TEHNICA EFECTUĂRII ANTIBIOGRAMEI MICOBACTERIILOR

Principiu: Se compară creșterea MTB însămânțat în mediul care conține substanțe anti-TB (tuburi test) cu creșterea pe tuburile de control (martor), care nu conțin aceste substanțe și se apreciază creșterea, respectiv lipsa creșterii pe tuburile test^{2,4}. Testarea se face pentru concentrații diferite de substanțe anti-TB, denumite concentrații critice care, cel puțin teoretic, corespund concentrațiilor realizate de substanța respectivă în sângele pacienților³². Pentru ca o cultură să fie considerată cu rezistență la o substanță anti-TB, trebuie să fie depășită proporția critică de creștere, care este stabilită pentru majoritatea substanțelor testate, la 1% din populația totală testată.

Rezultatele ABG au valoare orientativă și exprimă comportamentul *in vitro* al micobacteriilor, cu puține dovezi referitoare la relevanța clinică a rezultatelor³².

Dintre tehnicile standardizate recomandate de OMS²⁶, prezentăm mai jos metoda concentrațiilor absolute, metoda proporțiilor în mediul LJ și metoda proporțiilor în mediul lichid Middlebrook 7H9. Concentrațiile critice față de care se face testarea sunt revizuite, aprobate și comunicate de către OMS periodic și trebuie adoptate de către laboratoarele care fac ABG³².

Metoda concentrației absolute^{3,4}

1. *Numerotarea tuburilor* martor și test cu numărul din registru al tulpinii de testat. Odată cu numerotarea se verifică și aspectul macroscopic al mediului, lotul și data expirării. Tuburile se scot din frigider cu cel puțin 30 minute înainte de însămânțare, pentru echilibrare termică.

2. *Prepararea inoculului bacterian*

Folosește cultura de 21-30 zile de la data însămânțării:

- cultura primară cu creștere de 2+ sau 3+,
- subcultura în cazul culturii primare îmbătrânite sau sărace, dar nu mai puțin de 10 colonii pe cultura inițială. Pentru subkultură, indiferent de motiv, se prelevează din cât mai multe colonii pentru o cât mai bună reprezentare a populației bacteriene.

3. *Prepararea suspensiei bacteriene*

- Încarcă o ansă bacteriologică cu bacterii prelevate din cât mai multe colonii (cca 5 mg)
- Emulsionează în 2 ml ADS
- Așteaptă 30 minute să sedimenteze
- Trece supernatantul în alt tub, cu pipetă sterilă
- Ajustează turbiditatea prin adăugare de ADS în timp ce compari cu etalon de turbiditate McFarland nr 1 (corespunde la 1 mg/ml masă micobacteriană, aproximativ 1×10^8 UFC/ml)^{32a}.

Folosește pentru prepararea suspensiei bacteriene același tip de tub cu tubul etalon. Păstrează etalonul la întuneric și agită-l înainte de folosire. Înlocuiește-l dacă apar grunji.

4. *Diluarea suspensiei bacteriene*

- Ia din suspensia bacteriană de 1mg/ml (punct 3) o picătură (0.05ml) și diluează în 10 ml ADS (rezultă o diluție de 1/200).
- Schimbă pipeta la fiecare nouă diluție. Pipetează numai cu para.

5. *Însămânțează* câte 0.2 ml (4 picături) în fiecare tub martor și în fiecare tub test.

6. *Inundă* suprafața mediului și incubează la 36,5-37°C , timp de 48-72 ore înclinat, astfel încât suprafața pantei să fie orizontală, cu lichidul pe ea, cu capacul semi-înfiletat.

7. *Ridică* tuburile în poziție verticală și incubează în continuare până la 21 zile, când vei face citirea/interpretarea rezultatelor. Dacă creșterea pe tuburile martor este slabă, cu colonii punctiforme, rare, prelungește incubarea până la 28 zile, când faci citirea finală.

8. *Citirea și interpretarea rezultatelor ABG micobacteriilor.*

- verifică seria de tuburi corespunzătoare tulpinii de control *M. tuberculosis* ATCC. Pe tuburile martor creșterea trebuie să fie cu colonii numeroase, dar numărabile. Pe tuburile test să nu crească colonii.
- examinează **tuburile martor** ale tulpinilor de testat și notează creșterea bacteriană:
 - 50-100 colonii = 1+,
 - 100-200 colonii = 2+,
 - creștere > 200 colonii până la colonii confluențe = 3+.

Dacă sunt sub 50 colonii pe tubul martor sau nu s-au dezvoltat germeni (NSDG), ABG este neinterpretabilă.

Interpretează cu prudență a rezultatele în cazul creșterii a >20 colonii pe tuburile test și creștere de 3+ (confluent) pe tuburile martor.

Contaminarea cu microbi cu creștere rapidă se consemnează ca atare (denotă deficiențe de tehnică).

- *Examinează creșterea de pe **tuburile test** și se compară cu cea de pe tuburile martor.*
- *Rezultate:*
 - SENSIBIL = absența creșterii bacteriene sau < 20 colonii pe tubul test.
 - REZISTENT = mai mult de 20 colonii pe tubul test, la o anumită concentrație de substanță antituberculoasă, creșterea fiind egală, comparabilă cu cea de pe tubul martor.
 - NEINTERPRETABIL = creștere pe tubul martor a mai puțin de 50 colonii.
 - CONTAMINAT = cresc microbi de contaminare.

Metoda proporțiilor, mediul LJ, tehnica indirectă^{2,3,4}

1. *Numerotează tuburile martor și test cu numărul din registru al tulpinii de testat. Odată cu numerotarea verifică și aspectul macroscopic al mediului, lotul și data expirării. Scoate din frigider tuburile cu cel puțin 30 minute înainte de însămânțare, pentru echilibrare termică.*
2. *Prepararea inocului bacterian.*
Folosește cultura de 21-30 zile de la data însămânțării:

- cultura primară cu creștere de 2+-3+,
- sau subcultura în cazul culturii primare îmbătrânite sau sărace dar nu mai puțin de 10 colonii. Pentru subcultură, indiferent de motiv, se prelevează din cât mai multe colonii.

3. Pregătirea materialelor

- scoate din frigider mediile corespunzătoare numărului de tulpini care urmează să fie testate
- numerotează cu marker permanent câte o serie de tuburi pentru fiecare tulpină, cu numărul din registru al culturii și cu diluția inoculului, astfel: câte două tuburi martor pentru fiecare diluție a inoculului și câte un tub cu fiecare substanță antituberculoasă pentru fiecare diluție a inoculului.
- numerotează tuburile pentru prepararea suspensiei bacteriene, tuburile pentru prepararea inoculului standardizat și tuburile pentru prepararea diluției de însămânțat (câte 5 tuburi pentru diluții).
- repartizează câte 1 ml ADS în tuburile pentru prepararea suspensiei bacteriene și câte 9 ml în tuburile pentru prepararea diluțiilor. Pregătește și 2-3 tuburi ca rezervă.
- numerotează câte o lamă de microscop pentru fiecare cultură
- așează la îndemână:
 - Flacon cu ADS
 - Pipete sterile de 1 ml sau 2 ml cu pară
 - Substanțe dezinfectate - alcool medicinal

4. Prepararea și etalonarea suspensiei bacteriene

Deoarece toate manoperele sunt generatoare de aerosoli infecțioși, se va lucra în CPM, cu echipament pentru protecție personală. Pipetează numai cu pară. Schimbă pipeta la fiecare nouă diluție.

- încarcă o ansă bacteriologică cu bacterii prelevate din cât mai multe colonii (cca 5 mg) de pe mediul LJ, fără să fie antrenat și mediul.
- emulsionează în 1 ml ADS. La sfârșit etalează un spot pe lama cu numărul corespunzător al culturii. După uscare, fixează și colorează ZN frotiul
- completează cu ADS până la cca 3 ml. Omogenizează fără a barbota.
- așteaptă 30 minute să sedimenteze flocoanele mari.
- ia cu o pipeta sterilă supernatantul și trece-l într-un tub care are dimensiunile etalonului de turbiditate.
- ajustează turbiditatea prin comparare cu etalonul standard nr.1 McFarland. Suspensia micobacteriană astfel etalonată corespunde la aproximativ $1 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$.^{32a}
- păstrează etalonul în condițiile specificate de producător. Este îndepărtat în momentul în care apar grunji de aglutinare. Înainte de utilizare etalonul este omogenizat prin agitare.
- Etalonarea suspensiei bacteriene:
 - suspensia bacteriană din cele 2 eprubete (etalon și test) se compară ținându-le în fața unei hârtii albe cu linii negre de 2-3 mm, paralele și orizontale. Liniile trebuie să se vadă cu aceeași claritate prin cele 2 eprubete.
 - dacă suspensia bacteriană are turbiditatea diferită de a etalonului, se adaugă masă bacteriană sau ADS, după caz.

▪ se poate folosi aparat (densimat) pentru aprecierea turbidității date de bacterii
Citirea frotiurilor colorate ZN pentru confirmarea purității culturilor se face imediat după efectuare și nu se vor însămânța suspensiile bacteriene care conțin microbi de contaminare.

5. *Diluarea suspensiei bacteriene*

- ia 1 ml din suspensia bacteriană de 1mg/ml cu o pipetă sterilă și diluează în 9 ml ADS (diluție 10^{-1}).
- omogenizează cu altă pipetă, fără barbotare și ia 1 ml din diluția 10^{-1} , transvazează în 9 ml ADS (diluție 10^{-2}).
- continuă în același fel până la realizarea diluției de 10^{-5} .

Schimbă pipeta după fiecare diluție.

6. *Însămânțează din diluția 10^{-3} câte 0.2 ml în fiecare din cele două tuburi martor și în fiecare tub test marcat pentru această diluție.*

Însămânțează din diluția 10^{-5} câte 0.2 ml în fiecare din cele două tuburi martor și în fiecare tub test marcat pentru această diluție.

- inundă toată suprafața mediului cu atenție, astfel încât inoculul să nu ajungă la dop,
- incubează la 36,5-37°C, timp de 48-72 ore înclinat astfel încât suprafața pantei să fie orizontală, orientată în sus, cu capacul semi-înfiletat.
- după evaporarea lichidului, ridică tuburile în poziție verticală, închide-le complet și incubează în continuare până la 28 zile, când se face prima citire/interpretare a rezultatelor.

7. *Citirea și interpretarea rezultatelor ABG prin metoda proporțiilor, pe mediu LJ*

Citire la 28 și la 42 de zile (dacă este necesar).

Citirea antibiogramei. Prima citire se face după 28 de zile de la însămânțare. Se începe cu citirea rezultatelor pentru tulpina *M. tuberculosis* ATCC 25177, H37 Ra pusă în lucru pentru fiecare lot nou de mediu.

În interpretarea rezultatelor tuturor ABG care folosesc același lot se va face referire la această citire.

- numără coloniile crescute pe tuburile de control corespunzătoare diluțiilor 10^{-3} și 10^{-5} notând media numărului de colonii.
- numără coloniile crescute pe tuburile test corespunzătoare diluțiilor 10^{-3} și 10^{-5} .
- scrie numărul exact de colonii în registru și calculează proporția dintre numărul coloniilor crescute pe tuburile test și pe tuburile de control cu aceleași diluții. Scrie proporția calculată. În cadrul aceleiași diluții: nr colonii de pe tubul test x 100/ media numărului de colonii de pe tuburile martor.

Citire la 28 zile:

- Dacă pe tuburile test la nici una din diluțiile bacteriene nu este creștere bacteriană, se consideră tulpina SENSIBILĂ și se poate elibera rezultatul. Se notează S.
- Dacă creșterea pe tuburile test este mai mare decât 1% din media numărului coloniilor de pe tuburile martor se consideră că tulpina este REZISTENTĂ la acea substanță antituberculoasă. Se notează R.

Citire la 42 zile:

- Dacă pe tuburile test creșterea este mai mică decât 1% din media numărului coloniilor de pe tuburile martor se vor reincuba tuburile corespunzătoare tulpinii respective până la 42 de zile, când se face citirea finală și interpretarea rezultatelor ca la 28 de zile.

Metoda proporțiilor modificată, în sistem MGIT 960, tehnica indirectă

Testarea se poate face din cultura obținută în mediul lichid sau pe mediul solid LJ. Etapele de lucru sunt identice de la momentul însămânțării inoculului, însă acesta se prepară diferit, în funcție de mediul de creștere a culturii primare, fiind necesară parcurgerea etapelor prezentate în diagramele de mai jos (Tabel VII - X). Testarea folosind MGIT 960 se poate face pentru RMP, INH, SM, EMB, PZM, OfI, CAP, MOX, K. Testarea substanțelor anti-TB de linia a 2-a se face doar în LNR.

Tabel VII. Diagrama de lucru pentru testarea substanțelor anti-tuberculoase de linia întâi în sistem MGIT, din cultura pozitivă în mediul solid

Etape	MGIT SIRE - din cultura pe mediul solid
Reconstituire SIRE	1. Aduagă câte 4 ml ADS la fiecare flacon cu substanță anti-TB. (40 ABG) 2. Împarte câte 1 ml în criotuburi sterile (pt 10 ABG). Scribe data reconstituirii și data expirării. Se pot distribui cantități diferite, în funcție de volumul de lucru. 3. Congelare la – 20⁰ C maxim 6 luni. 4. Decongelează pentru folosire și ce rămâne se aruncă. Nu se recongelează!
Pregătire	1. Numerotează câte 5 tuburi MGIT pentru fiecare cultură și scribe: CC, S, I, R, E. 2. Plasează tuburile în această ordine în suportul de incubare. 3. Aduagă aseptice câte 0,8 ml supliment de creștere pentru SIRE (același lot cu kitul anti-TB), la fiecare tub. 4. Pipetează aseptice câte 100 μl din soluțiile stoc de SIRE în tuburile corespunzătoare.

Etapă	MGIT SIRE - din cultura pe mediul solid
Preparare inocul	1. Pune 4 ml mediu Middlebrook 7H9 în 1 tub steril cu dop, care conține 8-10 perle de sticlă (2-3 mm). 2. Prelevează cu ansa din cât mai multe colonii tinere (nu mai veche de 14-21 zile), evitând antrenarea mediului și descarcă în mediu. 3. Agită 2-3 minute pentru ruperea corzilor. Suspensia să fie cu turbiditate mai mare de 1 McFarland. 4. Lasă să sedimenteze 20 minute. 5. Transferă supernatantul în alt tub steril cu dop și lasă alte 15 minute să sedimenteze. 6. Transferă supernatantul (să nu mai aibă grunji sau corzi) în al treilea tub steril cu dop. Suspensia să fie mai intensă decât 0,5 McFarland. 7. Ajustează cu SFS la 0,5 McFarland prin comparare vizuală, dar nu mai puțin de 0,5 McFarland. 8. Diluează 1 ml din suspensia etalonată cu 4 ml SFS, și rezultă DILUȚIE 1:5 din suspensia 0,5 McFarland, care reprezintă INOCULUL
Prepara Control creștere CC	• Pipetează aseptice 0,1 ml din suspensia bacteriană INOCUL în 10 ml SFS și rezultă suspensia pentru control: 1:100. Omogenizează atent. • Însămânțează 0,5 ml din diluția 1:100 în CC.
Inocul tuburi SIRE	Însămânțează în fiecare tub cu substanțe anti-TB câte 0,5 ml (500 μl) din suspensia bacteriană preparată: INOCUL=DILUȚIE 1:5 din suspensia 0,5 McFarland.
CIC	Tulpina <i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177. Preparată identic cu tulpinile test.
Control puritate cultură	Însămânțează 0,1 ml din suspensia bacteriană în placă cu agar sânge, pune în pungă de plastic și incubează la 35-37° C, timp de 48 ore. Verifică placa cu agar sânge după 48 ore de incubare. Absența contaminării-corect, se lasă ABG în continuare la incubat în MGIT. Dacă este contaminare, se scoate ABG din incubator și se repetă din cultură pură.
Incubare	În suport cu 5 poziții, cu controlul în partea stângă.
Citire	Automată
Interpretare	Automată

Lucrează respectând precauțiile pentru protecția personală și a mediului (CPM, mască FFP2, mănuși, ochelari).
Folosește pipete calibrate.

Tabel VIII. Diagrama de lucru pentru testarea substanțelor anti-tuberculoase de linia întâi în sistem MGIT, din cultura pozitivă în sistem MGIT

Etape	MGIT SIRE - din cultura Pozitivă în sistem MGIT 960	
Reconstituire SIRE	1. Adaugă câte 4 ml ADS la fiecare flacon cu substanță anti-TB. (40 ABG) 2. Împarte câte 1 ml în criotuburi sterile (pt 10 ABG). Scrie data reconstituirii și expirării. Se pot distribui cantități diferite, în funcție de volumul de lucru. 3. Congelare la – 20 ⁰ C, maxim 6 luni. 4. Decongelează pentru folosire și ce rămâne se aruncă. Nu se recongelează!	
Pregătire	Numerotează câte 5 tuburi MGIT pentru fiecare cultură și scrie: CC, S, I, R, E. Plasează tuburile în această ordine în suportul de incubare. Adaugă aseptice câte 0,8 ml supliment de creștere pt SIRE (același lot cu kitul anti-TB), la fiecare tub. Pipetează aseptice câte 100 μl din soluțiile stoc de SIRE în tuburile corespunzătoare.	
Prepararea inoculului	1. Prima zi de pozitivare se consideră ziua 0. Nu se face ABG în ziua 0! 2. Se face ABG doar în zilele 1-5 după pozitivare. Cultura mai veche de 5 zile se subcultivă în alt tub.	
	Ziua de pozitivare	Conduita
	0	Nu se face ABG
	1 și 2	Se folosește cultura ca atare, după agitare = INOCUL
	3, 4, 5	După agitare se diluează 1:5 (1 ml cultură la 4 ml SFS) = INOCUL
	6 sau mai mult	Nu se face ABG. Necesită subcultură în tub nou pentru cultură, pornind de la cultura primară.
Prepară CC	- Pipetează aseptice 0,1 ml din suspensia bacteriană INOCUL în 10 ml SFS și rezultă suspensia pentru control: 1:100. Omogenizează atent. Însămânțează 0,5 ml din diluția 1:100 în CC.	
Inocul tub SIRE	Însămânțează în fiecare tub cu substanțe antiTB câte 0,5 ml (500 μl) din suspensia bacteriană preparată = INOCUL	
CIC	Tulpina <i>M tuberculosis</i> ATCC 25177. Preparată identic cu tulpinile test	
Control puritate cultură	Însămânțează 0,1 ml din suspensia bacteriană în placa cu agar sânge, pune în pungă de plastic și incubează la 35-37 ⁰ C, timp de 48 ore. Verifică placa cu agar sânge după 48 ore de incubare. Absența contaminării-corect, se lasă ABG în continuare la incubat în MGIT. Dacă este contaminare, se scoate ABG din incubator și se repetă din cultură pură.	
Incubare	În suport cu 5 poziții, cu controlul în partea stângă. La introducerea în incubator se verifică ordinea tuburilor pe monitor.	
Citire	Automată	
Interpretare	Automată	

Tabel IX. Diagrama de lucru pentru testarea pirazinamidei în sistem MGIT

Etape	MGIT PZM- din cultura Pozitivă MGIT	
Reconstituire SIRE	Adaugă 2,5 ml ADS la flaconul cu PZM. (25 ABG) Împarte câte 0,5 ml în criotuburi sterile (pt 5 ABG). Scrie data reconstituirii și data expirării. Congelare la – 20⁰ C maxim 6 luni. Decongelează pentru folosire și ce rămâne se aruncă! Nu se recongelează.	
Pregătire	Numerotează câte 2 tuburi MGIT PZM pentru fiecare cultură și serie: CC, Z. Plasează tuburile în această ordine în suportul de incubare cu 2 poziții. Adaugă aseptice câte 0,8 ml supliment de creștere pentru PZM (același lot cu kitul PZM), la fiecare tub. Pipetează aseptice 100 µl din soluția reconstituită de PZM în tubul corespunzător.	
Prepararea inoculului	1. Prima zi de pozitivare se consideră ziua 0. Nu se face ABG în ziua 0. 2. Se face ABG doar în zilele 1-5 după pozitivare. Cultura mai veche de 5 zile se subcultivă în alt tub.	
	Ziua de pozitivare	Conduita
	0	Nu se face ABG
	1 și 2	Se folosește cultura ca atare, după agitare. Se folosește ca inocul.
	3, 4, 5	După agitare se diluează 1:5 (1 ml cultură la 4 ml SFS). Se folosește ca inocul .
	6 sau mai mult	Nu se face ABG. Necesită subcultură în tub nou.
Prepară CC	- Pipetează aseptice 0,5 ml din suspensia bacteriană INOCUL în 4,5 ml SFS și rezultă suspensia pentru control: diluție 1:10. Omogenizează atent. Însămânțează 0,5 ml din diluția 1:10 în CC.	
Inocul tubul PZM	Însămânțează în tubul cu PZM 0,5 ml (500 microlitri) din suspensia bacteriană preparată = INOCUL	
CIC	Tulpina <i>M tuberculosis</i> ATCC 25177. Preparată identic cu tulpinile test.	
Control puritate cultură	Însămânțează 0,1 ml din suspensia bacteriană în placa cu geloză sânge, pune în punga de plastic și incubează la 35-37⁰ C, timp de 48 ore. Verifică placa cu geloză sânge după 48 ore de incubare. Absența contaminării-corect, se lasă ABG în continuare la incubat în MGIT. Dacă este contaminare, se scoate ABG din incubator și se repetă din cultură pură.	
Incubare	În suport cu 2 poziții, controlul în partea stângă.	
Citire	Automată	
Interpretare	Automată	

Tabel X. Diluarea culturii pozitive pe MGIT între zilele 3-5 după pozitivare

Cultura MGIT 3-5 zile	Diluarea culturii	Însămânțare
Diluție 1:5	4 ml SFS + 1 ml cultură	SIRE P test
Diluție 1:10	4,5 ml SFS +0,5 ml Dil 1:5	0,5 ml CC- PZM
Diluție 1:100	10 ml SFS + 0,1 ml Dil 1:5	0,5 ml CC- SIRE

Antibiograma în sistem VersaTREK

Kit-ul VersaTREK Myco este destinat testării sensibilității calitative *in vitro* a culturilor de *M. tuberculosis* la Rifampicină, Etambutol și Isoniazidă, cu ajutorul instrumentului VersaTREK.²⁷ Se pot testa culturi obținute pe mediul LJ sau culturi crescute în mediul lichid Middlebrook 7H9.

Pentru ABG în sistemul VT se utilizează simultan un mediu de cultură lichid (VersaTREK Myco Broth), un factor de creștere (VersaTREK Myco GS), concentrații precise de antibiotice anti-TB și un sistem de detecție care permite incubarea automatizată și monitorizarea continuă a tuburilor inoculate, cu citire a consumului de oxigen la fiecare 24 de minute. La finalul perioadei de incubare specifice, stabilită pentru fiecare probă testată, în funcție de timpul de pozitivare al flaconului martor (fără antibiotic), proba este evaluată manual ca fiind sensibilă sau rezistentă la substanța anti-TB.

Fiecărui flacon i se atașează un conector VersaTREK, realizându-se astfel un sistem închis de monitorizare a flaconului cu instrumentul. O membrană hidrofobă din conectorul VersaTREK previne aerosolizarea. Informațiile clinice sunt introduse în calculator, iar flacoanele sunt așezate în instrument pentru incubare la temperatura de 35° C, în condiții staționare.

În tabelele XI- XV sunt detaliate instrucțiunile de lucru pentru antibiograma în sistem VersaTREK.

Tabel XI. Diagrama de lucru pentru testarea substanțelor anti-tuberculoase de linia întâi în sistem VersaTREK, din cultura pozitivă pe mediul solid

Etape	VersaTREK RIE - din cultura pe mediul solid
Reconstituire IRE	Adaugă câte 25 ml ADS la fiecare flacon cu substanța antiTB (40 ABG) Păstrează maxim 4 săptămâni la 2-8⁰ C, sau împarte câte 5,5 ml în tuburi sterile (pt 10 ABG). Scrie data reconstituirii și data expirării. Se pot distribui cantități diferite, în funcție de volumul de lucru estimat Congelare la – 20⁰ C și folosește în maxim 3 luni. Decongelează pentru folosire și aruncă ce rămâne. Nu se recongelează!
Pregătire	Numerotează câte 4 tuburi VTM pentru fiecare cultură. și scrie: CC, R, I, E. Plasează tuburile în această ordine în suport. Adaugă aseptice câte 1ml supliment de creștere (Myco GS) pentru RIE (același lot cu kitul anti-TB), la fiecare tub, inclusiv CC. Pipetează aseptice câte 0,5 ml din soluțiile stoc de RIE în tuburile test și 0,5 ml ADS în tubul CC (controlul creșterii)
Prepararea inoculului bacterian	Pune 4 ml ADS în 1 tub steril cu dop, care conține 8-10 perle de sticlă (2-3 mm). Prelevează cu ansa din cât mai multe colonii tinere (nu mai veche de 14-21 zile), cultură pură, evitând antrenarea mediului și descarcă în ADS. Agită 2-3 minute pentru ruperea corzilor. Suspensia să fie cu turbiditate mai mare de 1 McFarland. Lasă să sedimenteze 20 minute. Transferă supernatantul în alt tub steril cu dop și lasă alte 15 minute să sedimenteze. Transferă supernatantul (să nu mai aibă corzi!) în al treilea tub steril cu dop. Suspensia să fie mai intensă decât 1 McFarland. Ajustează cu ADS la 1 McFarland prin comparare vizuală, dar nu mai puțin de 1 McFarland (1 (aproximativ 3x10⁷ UFC/ml), Diluează 1:10 din suspensia etalonată: 9 ml ADS+ 1 ml suspensie etalonată) = INOCULUL.
Inoculare Control creștere	• Însămânțează 0,5 ml din diluția 1:10 în tubul marcat CC.
Inoculare tuburi RIE	Însămânțează în fiecare tub cu substanțe anti-TB câte 0,5 ml (500 microlitri) din suspensia bacteriană preparată: INOCUL = DILUȚIE 1:10 din suspensia 1 McFarland. Amestecare prin inversarea tubului de 3-5 ori.
CIC	Tulpina <i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177. Preparată identic cu tulpinile test.

Etape	VersaTREK RIE - din cultura pe mediul solid
Control puritate cultură	Însămânțează 0,1 ml din suspensia bacteriană în placă cu geloză sânge, pune în pungă de plastic și incubează la 35-37 ⁰ C, timp de 48 ore. Verifică placa cu geloză sânge după 48 ore de incubare. Absența contaminării-corect, se lasă ABG în continuare la incubat în VT. Dacă este contaminare, se scoate ABG din incubator și se repetă din cultură pură.
Incubare	În sertarele sistemului, după montarea conectorului la fiecare flacon. Tuburile nu se mai inversează după montarea conectorului!
Citire	Automată, la fiecare 24 minute. CC trebuie să fie pozitiv între > 3 zile, dar < de 10 zile, cu semnal pozitiv acustic și luminos. După pozitivarea CC testul mai durează 3 zile- cu urmărire de către executant (vezi detelii mai jos, la rezultate). Consemnare în caietul de lucru.
Interpretare	Rezistent: creștere pe tub test în interval de 3 zile după CC, Sensibil: fără creștere pe tub test în interval de 3 zile după CC. Creșterea după 3 zile nu indică rezistență.

Dacă se dorește efectuarea ABG în sistem VT din cultură din mediul solid sau din mediul lichid, pentru obținerea culturii de testat se procedează astfel:

- Pune 4 ml ADS în 1 tub steril cu dop, care conține 8-10 perle de sticlă (2-3 mm).
- Prelevează cu ansa din cât mai multe colonii, cultură pură, evitând antrenarea mediului și descarcă în ADS.
- Agită 2-3 minute pentru ruperea corzilor. Suspensia să fie cu turbiditate mai mare de 1 McFarland; sau agită tubul cu cultura în VTM pe care dorești să o testezi.
- Lasă să sedimenteze 20 minute.
- Transferă supernatantul în alt tub steril cu dop.
- Ajustează cu ADS la 1 McFarland prin comparare vizuală.
- Pipetează 0,5 ml suspensie în flacon VTM marcat și 1 ml supliment GS.
- Montează conectorul și incubează în sistem până la pozitivare.
- Efectuează ABG în interval de maxim 72 de ore de la pozitivare.
- Agită flaconul 1-2 minute, transferă 1 ml din cultură în tub care conține 9 ml ADS: diluție 1:10 = INOCUL.
- Pipetează 0,5 ml din inocul la tuburile pregătite ca mai sus (CC, RIE)

Pentru măsurarea tuturor cantităților se folosesc pipete calibrate.
Se lucrează în condiții de asigurare a protecției personalului și mediului (CPM, mască, halat de protecție, mănuși).

Dizolvarea substanțelor antiTB și concentrațiile rezultate este prezentată în tabelul XII.

Tabel XII. Dizolvarea substanțelor antiTB și concentrațiile rezultate

Conc finală a substanței în flaconul VTM	ADS pentru dizolvare/rehidratare	Concentrație după rehidratare	Cantitate introdusă în flacon VTM	Număr teste/flacon (x2= nr teste/chit)
RMP 1 µg/ml	25 ml	30 µg/ ml	0,5 ml	50
INH 0,4 µg/ml		12 µg/ ml		40
EMB 8 µg/ ml		240 µg/ ml		30

Notă: INH este substanța cu rol limitativ. Chiar dacă mai sunt disponibile celelalte substanțe dizolvate din același lot, ele se vor debarasa. Nu se amestecă substanțe din loturi diferite.

Tabel XIII. Adăugarea reactivilor și a substanțelor de inoculare la flacoanele de testare

VTM etichetat, numerotat	Volum de GS de pipetat	Volum de substanță antiTB de pipetat	Diluție 1:10 din cultură, INOCUL
1 µg/ ml Rifampicină	1 ml	0,5 ml RMP	0,5 ml
0,4 µg/ ml Isoniazidă	1 ml	0,5 ml INH	0,5 ml
5 µg/ ml Etambutol	1 ml	0,5 ml EMB	0,5 ml
Control creștere	1 ml	0,5 ml ADS	0,5 ml

Introducerea flacoanelor în sistem:

- Scrie pe fiecare flacon numărul de identificare și substanța anti-TB.
- Formatul pentru numărul de acces este „Acces ” XY, unde „Acces” va fi echivalent cu numărul de accesări pentru o cultură; X este codul substanței (R, I, E), iar Y este concentrația sa.

Exemplu:

Control creștere	Număr de acces = 1234 CC
Rifampicină 1,0 µg/ml	Număr de acces = 1234 R1
Isoniazidă 0,4 µg/ ml	Număr de acces = 1234 I0.4
Etambutol 8 µg/ ml	Număr de acces = 1234 E8

- Plasează pe rând flacoanele de cultură cu conectorul VersaTREK în instrument.
- Creșterea va fi semnalată de instrument. Momentul acesteia poate fi aflat prin urmărirea graficului cu rezultatul testării.

Rezultate

- Testul trebuie finalizat în maxim 13 zile, în funcție de flaconul de control.
- După ce CC se pozitivează, urmărește pe graficul de la flacoanele test corespunzătoare tulpinii, timpul scurs până la pozitivarea lor. Scrie și în caietul de lucru.
- După trei zile suplimentare de incubare, rotunjit la cel mai apropiat număr întreg, ulterior pozitivării CC, caută și înregistrează rezultatele celorlalte flacoane corespunzătoare culturii.

Sensibil: cultura pură într-un flacon care conține substanță anti-TB, fără semnal pozitiv în intervalul de 3 zile după pozitivarea CC este considerată sensibilă la concentrația de substanță testată.

Rezistent: cultura pură într-un flacon care conține substanță anti-TB, este considerată rezistentă la acea concentrație de substanță testată atunci când timpul până la semnal pozitiv este egal, sau în intervalul de trei zile (rotunjit până la cel mai apropiat număr întreg) de timpul până la pozitivare al CC.

În Tabelul XIII este prezentat un exemplu de evaluare și interpretare a rezultatelor ABG TREK, cu identificarea erorilor posibile și acțiunilor corective.

Flacoanele care au generat semnale pozitive trebuie confirmate cu frotiu ZN. Dacă se identifică organisme non-BAAR, se va efectua o subcultură pe o placă cu mediul geloză sânge, care se va incuba pentru cel puțin 18 ore într-un incubator obișnuit la temperatura de 35-37°C, pentru a verifica puritatea izolatului.

Tabel XIV. Observații asupra testării și evaluarea testării

Flacon test	Rezultat obținut	Cauze posibile	Acțiune
Control CC	< 3 zile de la însămânțare	Contaminare sau inocul prea bogat; verifică puritatea plăcilor și graficele de creștere	REPETĂ TESTUL din cultură pură
Control CC	> 10 zile de la însămânțare	Organism neviabil; inocul prea slab	REPETĂ TESTUL, cu atenție la realizarea inoculului
Control CC	Creștere detectată în interval între 3 și 10 zile după inoculare		TEST VALID – verifică flacoanele test
Verificare puritate	Nu s-a observat nici un contaminant pe placa cu geloză sânge în intervalul de 18 ore Frotiu ZN: doar BAAR Nu s-a observat nici o variație colonială pe LJ Variație a morfologiei coloniilor pe LJ	Cultura nu a fost pură Este prezentă mai mult de o specie de <i>Mycobacterium</i>	Test valid REPETAȚI TESTUL pentru a verifica rezultatele; anunțați medicul că rezultatul nu se poate finaliza.

Întotdeauna revedeți graficul corespunzător fiecărei culturi pure înainte de a raporta un rezultat. Citiți Manualul de Operare VersaTREK pentru detalii legate de analiza graficelor. Verificați rezultatele subculturilor pe mediu LJ pentru a confirma prezența unei singure specii de *Mycobacterium*. Se testează exclusiv complexul *M. tuberculosis*.

Tabel XV. Exemplu de rezultate pentru orientarea interpretării rezultatelor ABG VersaTREK

	Control creștere	Substanța antiTB		
		Isoniazidă	Rifampicină	Etambutol
Concentrație substanță	0	0,4μg/ ml	1,0 μg/ ml	8 μg/ ml
Zile până la semnalul pozitiv	6	12 fără creștere	6	10 fără creștere
Interpretare	---	Sensibil	Rezistent	Sensibil

Comentarii la exemplul dat: Termenul de încheiere a testării este de 9 zile, raportat la CC care a generat semnalul pozitiv după 6 zile (timpul de Control pentru detecție + 3 zile). Orice creștere observată după perioada de testare de 9 zile trebuie ignorată deoarece aceasta nu reprezintă un indicator al rezistenței.

Remarci ale producătorului

Kit-ul pentru ABG VTM nu ar trebui să fie utilizat cu izolate obținute direct din flacoanele cu specimene pozitive (flacoane primare).

Producătorul este responsabil pentru autorizarea componentelor sistemului.

Testarea fiecărui antibiotic din kit se va realiza numai cu loturi de mediu VersaTREK Myco și VersaTREK Myco GS iar activitatea fiecărei substanțe va fi evaluată cantitativ.

În Certificatul de analiză al produsului este menționat un interval pentru limitele de activitate pentru fiecare substanță antiTB.

Producătorul va aproba și furniza loturi de mediu VersaTREK Myco și VersaTREK Myco GS care urmează să fie utilizate împreună cu fiecare lot al kit-ului pentru ABG Myco VersaTREK iar utilizatorul va folosi aceste loturi la efectuarea testării în laborator.

Utilizatorul va verifica dacă loturile de mediu VersaTREK Myco și VersaTREK Myco GS au fost aprobate pentru a fi utilizate împreună cu kit-ul de ABG Myco VersaTREK înainte de începerea testării. Loturile aprobate sunt enumerate în Certificatul de analiză pentru fiecare kit în parte. Examinați vizual toate flacoanele pentru a detecta contaminarea, fisuri sau alte semne de deteriorare. Nu folosiți flacoane care par tulburi sau deteriorate. Inocularea se poate realiza prin deschiderea flacoanelor și adăugarea probelor cu ajutorul pipetelor sterile.

5. Metode de biologie moleculară

Pentru diagnosticul TB prin metode de biologie moleculară sunt disponibile mai multe metode bazate pe principii diferite, care pot identifica secvențe genetice micobacteriene diverse. Dintre acestea, în laboratoarele rețelei naționale de micobacteriologie se folosesc în condiții de program de control al TB două sisteme. Unul bazat pe revers-hibridizare pe suport de nitroceluloză- LPA

(GenoType-HAIN), celălalt bazat pe reacție cantitativă de polimerizare în lanț a ADN în timp real – RTPCR (GeneXpert MTB-Rif- Cepheid).

Metodele moleculare de hibridizare pe suport permit detecția rapidă a rezistenței la RMP (singura sau în asociere cu INH) și au fost aprobate de către OMS încă din anul 2008, când s-au emis ghiduri de introducere a lor la nivel național^{32,33}. Dezavantajul metodelor de hibridizare este că la INH rezistența poate fi subestimată, se detectează doar MDR, fiind necesară ABG convențională pentru detecția TB extrem de rezistentă (XDR), iar pentru monitorizarea tratamentului cazurilor MDR este necesară cultura și ABG convențională pentru aflarea spectrului complet de rezistență³³.

Dacă se confirmă rezistența la RMP sau TB-MDR prin unul din testele de biologie moleculară folosit, se recomandă efectuarea imediată a testului GenoType MTBDRsl direct pentru identificarea rapidă a rezistenței la aminoglicozide și fluorochinolone.^{33a}

Sistemul **GenoType** folosește un ansamblu de echipamente, specifice pentru fiecare etapă de lucru, cu chituri de reacție diferite în funcție de scopul testării:

- **MTBDRplus** este kitul de analiză genetică folosit pentru identificarea simultană a complexului *M.tuberculosis* și evidențierea mutațiilor de rezistență la RMP și INH, iar în cazul **MTBDRsl**, pentru identificarea cazurilor de TB-XDR prin evidențierea mutațiilor de rezistență la aminoglicozide și fluorochinolone.
- Kiturile **MTBC** și **CM** sunt folosite pentru identificarea speciilor de *Mycobacterium* în culturile pozitive pe mediul solid LJ și mediul lichid în sistem MGIT.

Deoarece producătorul are o politică de îmbunătățire continuă a performanțelor metodelor, acesta include o *fișă de avertizare* în ambalajul care conține reactivii dintr-o versiune nouă și este necesar să se acorde atenție acestor informații. În această fișă se face trimitere la instrucțiunea de lucru care va trebui folosită în noile condiții.

Instrucțiune de lucru pentru GenoType^{34,35}

EXTRACȚIA ADN

Pregătirea materialului în vederea extracției ADN-ului micobacterian

- produsul patologic (specimen clinic), în cazul MTBDRplus și sl
- cultura în mediul lichid
- cultura în mediul solid.

Produsul patologic

Produsele patologice (spută, lavaj bronho-alveolar, aspirat bronșic) trebuie păstrate la frigider la 2-8°C până la maximum 4 zile.

După decontaminarea prin metoda Petroff sau NALC-NaOH se resuspendă sedimentul în 1 ml SFS până la un volum total maxim de 1,5 ml. Sedimentul astfel prelucrat poate fi păstrat la congelator la -20°C până la -80°C maxim 5 zile.

Pregătirea extracției ADN

Din sedimentul rezultat după decontaminare:

- transferă 500 μ l în microtuburi conice de 1,5 ml cu capac înfiletat
- centrifughează 15 min la 10 000 x g
- îndepărtează complet cu pipeta supernatantul și resuspendă sedimentul în 100 μ l tampon Lys (A-Lys) prin vortexare scurtă.
- colectează materialul infecțios rezultat în timpul lucrului în recipiente dedicate care conțin dezinfectant micobactericid.

Din cultura în mediu lichid

- transferă 1000 μ l din cultura în mediul lichid omogenizat în prealabil prin agitare ușoară, în microtuburi conice de 1,5 ml cu capac înfiletat
- centrifughează 15 min la 10 000 x g
- îndepărtează complet supernatantul și resuspendă sedimentul în 100 microlitri Lys Buffer (A-Lys) prin vortexare scurtă.
- colectează materialul infecțios rezultat în timpul lucrului în recipiente dedicate care conțin dezinfectant micobactericid.

Din cultura în mediu solid

- prepară suspensia bacteriană prin colectarea cu ansa bacteriologică de unică folosință din cât mai multe colonii.
- resuspendă coloniile direct în 100 μ l Lys Buffer (A-Lys), în microtuburi conice de 1,5 ml cu capac înfiletat, urmat de vortexare scurtă.

În cazul kitului Mycobacterium CM ver 2.0, pentru fiecare probă se amestecă cei 100 microlitri Lysis Buffer (A-Lys) cu câte 2 microlitri control intern (IC) prin vortexare.

Extracția propriu-zisă a ADN se continuă cu următoarele etape, indiferent de natura produsului prelucrat în vederea extracției, prin metodă chimică sau fizică (ultrasonicare).

Extracție chimică

- incubează 5 min probele la 95°C în baie de apă
- agită puțin în microcentrifugă (spin-down)
- adaugă 100 μ l tampon pentru neutralizare (A-NB) și vortexează minim 5 sec.
- apoi pune pentru 5 min la viteza maximă a microcentrifugii (14 500 rpm)
- **5 μ l supernatant (soluție ADN)** se folosesc în reacția PCR.

Extracție prin ultrasonicare

- Dacă ai resuspendat coloniile în apă PCR, incubează 25 minute în THERMOBLOCK pentru denaturare la 95°C.
- pornește baia de ultrasonicare și pune probele pentru 20 minute
- apoi pune pentru 5 min la viteza maximă a microcentrifugii (14 500 rpm)
- **5 μ l supernatant (soluție ADN)** se folosesc în reacția PCR.

Pentru păstrarea de durată (indefinită) a ADN-ului extras, supernatantul rămas se transferă într-un tub nou, ADN free și se congelează la -80°C. Alocotare dacă se consideră necesar.

AMPLIFICAREA PCR

- În cazul kiturilor MTBDR*plus*, MTBDR*sl*, CM ver 2.0 și MTBC se va prepara amestecul de nucleotide (mastermix) prin amestecarea Mixului de amplificare A cu B din componenta 2 a kitului, păstrată la -20°C. AM-A conține tampon, nucleotide și ADN polimeraza; AM-B conține primeri biotinilați și colorant.
- După reechilibrarea termică a soluțiilor în aria prePCR, se amestecă pentru fiecare probă de testat câte 10 μl AM-A cu 35 μl AM-B (conform tabelului XVI).

Amestecul este instabil și este necesară preparare de fiecare dată când se lucrează, într-o zonă fără sursă posibilă de ADN contaminant.

Se verifică de fiecare dată etichetele de pe flacoanele cu reactivi pentru amplificare astfel încât ampliconul rezultat să corespundă cu stripul specific folosit pentru testul dorit.

Conținutul unui flacon AM-A cu al unui flacon AM-B în amestec este suficient pentru 26 probe.

Calcul AM-A+AM-B = număr probe + număr controale + rezervă o probă

Control negativ, pentru controlul extracției (ENC): 5 μl apă PCR (în loc de ADN)

Control pozitiv MTBC sensibil (H37 Ra) sau MTBC cu rezistență cunoscută: 5 μl ADN

Prepararea amestecului de amplificare (tabelul XVI):

- GenoType MTBDR*plus* ver 2.0
- GenoType MTBDR*sl* ver 2.0
- GenoType MTBC ver 1.x

Tabel XVI. Cantitățile necesare pentru realizarea amestecului de nucleotide în funcție de numărul de probe de testat

Pipeta de folosit AM-A	AM-A (μl)	NR. PROBE	AM-B (μl)	Pipeta AM-B	Pipeta Mix
10-100	10	1	35	10-100	10-100
	50	5	175	100-1000	100-1000
100-1000	100	10	350		
	120	12	420		
	150	15	525		
	200	20	700		
	240	24	840		
	480	48	1680		

Mix: amestec de nucleotide. Polimeraza este inclusă în reactivi.

În cazul kitului CM versiunea 2.0 (Common Mycobacterium-specii comune, altele decât TB) prepararea amestecului de nucleotide se face tot conform tabelului XVI.

Adu amestecul pregătit în camera pre-PCR spre **camera de amplificare** în cutii separate pentru fiecare tip de test și **aici adaugi ADN-ul extras în microtuburi și începi amplificarea.**

Conectează aparatul **GTQ-Cycler 96** la rețeaua electrică.

Așează microtuburile de 0,2 ml cu probe în locașurile centrale.

Închide capacul.

Pornește programul:

- MDR-DIR.scr pentru testul MTBDR*plus* direct și pentru testul MTBDR*sl* direct
- MDR-CUL.scr pentru testul MTBDR*plus* indirect, MTBDR*sl* indirect MTBC sau CM

La volum/probă se introduce valoarea de 50 µl.

Selectează RUN PROGRAM.

După terminarea ciclurilor scoate tuburile cu amplicon și pastrează-le până a doua zi la frigiderul din camera de amplificare, în cutii separate, etichetate.

HIBRIDIZAREA PROBELOR CU GT-BLOT 48

Reactivii au dopuri colorate diferit pentru prevenirea confuziilor. În tabelul XVII sunt prezentate codurile de culori ale reactivilor folosiți pentru hibridizare.

Tabel XVII. Codul de culori al reactivilor

Reactiv	Culoare	Reactiv	Culoare
HIBRIDIZANT	VERDE	CONJUGAT	PORTOCALIU
STRINGENT	ROȘU	APA	ALBASTRU
RINSE	ALB	SUBSTRAT	GALBEN

1. Desfă tija de susținere a tăviței pentru stripuri (bandelele de nitroceluloză)
2. Ridică senzorul central și poziționează-l în interiorul tăviței
3. Apasă butonul START și selectează **GT FAST V2**
4. Pipetează 20 µl sol **DEN** în fiecare godeu și 20 µl **amplicon**, începând cu primul godeu de sus, amestecând ușor cu vârful pipetei, fără barbotare.
5. Pune reactivii **HYB**, **STR** și **RIN** cu flaconul original în suportul aparatului și imersează sonda corespunzătoare în soluție.
6. Apasă butonul START și **selectează numărul de godeuri de lucru** cu săgeata < > (rândul 1 sus, rândul 2 jos)
7. Dacă numărul de probe este mai mic de 22 și senzorul nu are strip în godeul respectiv, aici trebuie puși 5 µl soluție HYB. Godeurile fără stripuri vor fi umplute cu apă de către sistem.
8. Pune ADS în flaconul cu capac albastru.
9. START. Închide capacul protector cu atenție. Se pornește automat pipetarea soluției **HYB**.
10. Când pe ecran apare **`Add amplicon`** ridică capacul, imersează cu pensa stripurile specifice fiecărui test în godeuri în sol **HYB**, fără contaminarea pensei.

11. Închide capacul și dă START.
12. În partea stânga jos a GT Blot apare cu *led verde temperatura de lucru setată și cu led roșu temperatura realizată*.
13. Introdu sonda corespunzătoare în flaconul cu soluția **STR preîncălzită la 37°C** în ultimele 10 minute de HYBRIDIZATION.
14. Prepară amestecul de **CON-C** cu **CON-D** (amestec instabil, de preparat proaspăt de fiecare dată) și **SUB-C** cu **SUB-D** (stabil 4 săptămâni la temperatura camerei, protejat de lumină). Calcularea volumului de reactivi se face conform tabelului XVIII:

Tabel XVIII. Calcularea volumului de reactivi necesari în funcție de numărul probelor

Nr probe	Plus necesar de reactivi	CON-D ml	CON-C Ml	SUB-D ml	SUB-C μ l
1		1	10	1	10
<10	Calculat ca pt. 20 probe	20	200	20	200
10-15	+10	25	250	25	250
16-25	+12	37	370	37	370
26-35	+14	49	490	49	490
36-39	+16	55	550	55	550
40-43	+22	65	650	65	650
44-48	+24	72	720	72	720

15. În ultima etapă de reacție cu substratul, stinge lumina pentru a proteja godeurile de lucru.
16. După terminarea spălărilor scoate stripurile cu grijă, păstrând ordinea lor, usucă-le pe suport de hârtie absorbantă apoi lipește-le pe formularul pentru teste.

Curățarea aparatului

1. După ultima spălare, scoate sondele din toate flacoanele de lucru și spală în recipientul cu ADS caldă; după uscare așează-le înapoi în flacoanele aparatului, marcate în prealabil.
2. Îndepărtează la deșeuri CON de lucru, spală flaconul aparatului cu ADS și usucă.
3. SUB de lucru rămas se poate păstra până la 4 săptămâni într-un flacon cu pereți opaci, la temperatura camerei în spațiu întunecos.
4. Spală cu ADS flaconul aparatului, usucă și așează sonda în interior.

La terminarea ciclurilor de spălare se poate începe o nouă serie de hibridizare, pentru alte probe. În cazul în care nu se dorește o nouă hibridizare, aparatul se oprește din butonul START/STOP de pe panoul din spate stânga.

Cu ajutorul unei pensule se înlătură orice urmă de reactiv din godeurile de lucru ale aparatului și ale tăviței folosite.

Scoate tăvița din aparat și pulverizeaz-o cu reactiv decontaminant LTK și ADS. Un șir de godeuri al tăviței se folosește de maxim două ori la hibridizare, de aceea trebuie marcat pe laterală fiecare folosire.

Spălarea aparatului

Programul de spălare se poate porni doar după parcurgerea tuturor etapelor de lucru, folosind ADS caldă în loc de reactivi și scurtând diferitele etape, după cum urmează:

- În etapele cu încălzire, apasă pe tasta QUIT, întrerupe alarma sonoră apăsând pe tasta START de două ori.
- În etapele fără încălzire, apasă lung pe tasta săgeată dreapta.

Control intern al GT Blot 48 (aparatul atenționează necesitatea)

Din 3 în 3 luni se derulează ciclul de control OQ. În panoul SETTINGS, apasă pe OPEN în `Cycler information`, în `Cycler Management` apasă pe CYCLER TESTS și pe ENGINE TEST până când apare OK.

Disfuncționalitățile aparatelor se consemnează în fișele tehnice și se comunică reprezentantului furnizorului.

EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Pentru evaluarea și interpretarea reacției, stripurile trebuie uscate și fixate în poziție corectă pe fișa de lucru.

La fiecare probă se verifică:

- apartenența la Complexul *M.tuberculosis* (banda TUB pozitivă),
- martorul reacției de amplificare (AC) și
- martorul reacției de conjugare (CC).

Lipsa uneia dintre aceste benzi indică erori în cadrul procesului de amplificare, testul nu este validat și se impune retestarea folosind altă probă.

În cazul controlului negativ (ENC - extraction negativ control) pe strip trebuie să apară doar benzile CC și AC. Prezența de benzi suplimentate semnaleză contaminarea, iar rezultatele pentru pacienți nu pot fi interpretate corect. Se analizează sursa contaminării și se fac corecțiile necesare.

Rezultate pentru GenoType MTBDRplus

După ce testul a fost validat, urmează verificarea prezenței benzilor de control pentru genele *rpoB*, *katG*, *inhA*, a benzilor pentru tipurile sălbatice și pentru mutații:

- locus control (*rpoB*, *katG*, *inhA*)
- wild type WT (lipsa acestora semnifică deleție sau mutație în secvența respectivă)
- mutații existente MUT atât la *rpoB* (pentru RMP), cât și la *katG* și *inhA* (pentru INH).

Locus control (*rpoB*, *katG*, *inhA*)

Prezența benzilor este obligatorie dacă zona TUB atestă prezența *M. tuberculosis*.

În cazul unui rezultat pozitiv, semnalul acestor zone poate fi slab sau, în unele cazuri, inexistent.

În cazuri rare, locusul *katG* poate lipsi complet (inclusiv banda Locus Control) semnificând rezistență la INH a tulpinii testate.

Dacă benzile *rpoB* și/sau *inhA* nu sunt evidente, testul nu poate fi evaluat pentru aceste gene.

Secvențe tip sălbatic (wild type - WT)

RMP

Se iau în considerare doar benzile al căror semnal este la fel de puternic sau mai puternic decât semnalul din zona de control (AC). Sunt 8 secvențe sălbatice notate de la WT1 până la WT8.

Sondele *rpoB* WT reprezintă o excepție de la această schemă de evaluare.

Un semnal mai slab decât zona (AC) în zona *rpoB* WT8 trebuie considerat pozitiv dacă banda corespunzătoare mutației *rpoB* MUT3 nu este evidentă, (deci nu semnifică rezistență la RMP).

INH

Sunt luate în considerare doar benzile al căror semnal este la fel de puternic sau mai puternic decât semnalul exprimat în zona de control (AC). În zona *katG* există un singur WT, iar la *inhA* WT1 și WT2.

Rezistența de nivel înalt este indicată de mutațiile în *katG* (codifică enzima activatoare: catalaza).

Rezistența de nivel jos este indicată de mutațiile în *inhA* (codifică enzima enoyl-ACP reductaza) și regiunea promotor (gene reglatoare).

Sonde de tip mutant

Sondele tip mutant detectează cele mai frecvente mutații de rezistență.

Sunt luate în considerare doar benzile al căror semnal este la fel de puternic sau mai puternic decât semnalul exprimat în zona AC.

Comparativ cu alte sonde, semnalele pozitive pentru mutațiile *rpoB* MUT2A și *rpoB* MUT2B pot apărea mai slabe ca intensitate.

Dacă banda *rpoB* MUT3 este pozitivă, un semnal slab detectat în zona *rpoB* WT8 trebuie considerat negativ (cu semnificație de rezistență la RMP).

Variantele de rezultat la testul Genotype MTBDRplus:

- MTBC nedetectat – în cazul absenței benzii TUB
- MTBC detectat cu rezultat invalid pentru mutații de rezistență la RMP și/sau INH (absența benzilor locus/WT la *rpoB* și/sau *inhA*)
- MTBC detectat cu prezența benzilor TUB și WT fără mutații; rezistențe nedetectate.
- MTBC detectat cu prezența benzilor TUB cu absența WT și prezența MUT la *rpoB* și *katG* sau *inhA*; rezistențe detectate (MDR)
- MTBC detectat, cu test invalid pentru *rpoB*, valid pentru *katG* și *inhA*
- MTBC detectat, cu test valid pentru *rpoB* și invalid pentru *inhA*.

Rezultate pentru GenoType MTBDRsl

După ce testul a fost validat, urmează verificarea prezenței benzilor de control pentru genele *gyrA*, *gyrB*, *rrs* și *eis*, a benzilor pentru tipurile sălbatice și pentru mutații:

- locus control (*gyrA*, *gyrB*, *rrs* și *eis*)
- wild type WT (lipsa acestora semnifică modificări în secvența respectivă)
- mutațiile MUT existente, la *gyr A* și/sau *gyr B* (pentru fluoroquinolone), *rrs* (pentru aminoglicozide), *eis* (pentru kanamicină)

Locus control (gyr A, gyr B, rrs și eis)

Prezența lor este obligatorie dacă zona TUB atestă prezența *M. tuberculosis*.

În cazul unui rezultat pozitiv, semnalul acestor zone poate fi slab sau, în unele cazuri, inexistent.

Secvențe tip salbatic (wild type - WT)

Se iau în considerare doar benzile a căror intensitate este la fel de puternică sau mai puternică decât semnalul exprimat în zona de control pentru amplificare (AC).

gyrA: 3 secvențe notate de la WT1 la WT3.

gyr B: 1 secvență notată WT1.

rrs: 2 secvențe WT1 și WT2.

eis: 3 secvențe notate de la WT1 la WT3.

Sonde tip mutant

Sondele tip mutant detectează cele mai frecvente mutații de rezistență. Se iau în considerare doar benzile al căror semnal este la fel de puternic sau mai puternic decât semnalul exprimat în zona AC.

Variantele de rezultat pentru testul Genotype MTBDRsl:

- MTBC nedetectat – în cazul absenței benzii TUB
- MTBC detectat cu rezultat invalid pentru mutații de rezistență la Q și/sau AG și/sau K (absența benzilor locus/WT la *gyr* și/sau *rrs* și/sau *eis*)
- MTBC detectat cu prezența benzilor TUB și WT fără mutații
- MTBC detectat cu prezența benzii TUB cu absența WT și prezența MUT la *gyrA* și/sau *gyrB*, la *rrs* și/sau *eis*.

- MTBC detectat cu prezența benzilor TUB și WT pentru *gyrA*, *gyrB* și absența WT cu prezența MUT la *rrs* și/sau *eis*
- MTBC detectat cu QrAGn – prezența benzilor TUB și WT la *rrs* și *eis* și absența WT cu prezența MUT la *gyrA* și/sau *gyrB*

Rezultate pentru GenoType MTBC și CM

În cazul acestor teste de identificare a speciei de *Mycobacterium* se verifică:

- Prezența benzilor control de CC și UC
- Prezența benzii de conjugare MTBC în cazul testului GenoType MTBC
- Prezența benzii de conjugare GC în cazul testului GenoType CM

După identificarea benzilor de control se citește combinația benzilor de conjugare cu intensitatea cel puțin egală cu a benzii control UC, se notează pe fișele de lucru și se compară cu tabelul conținând combinațiile de benzi pentru speciile identificate.

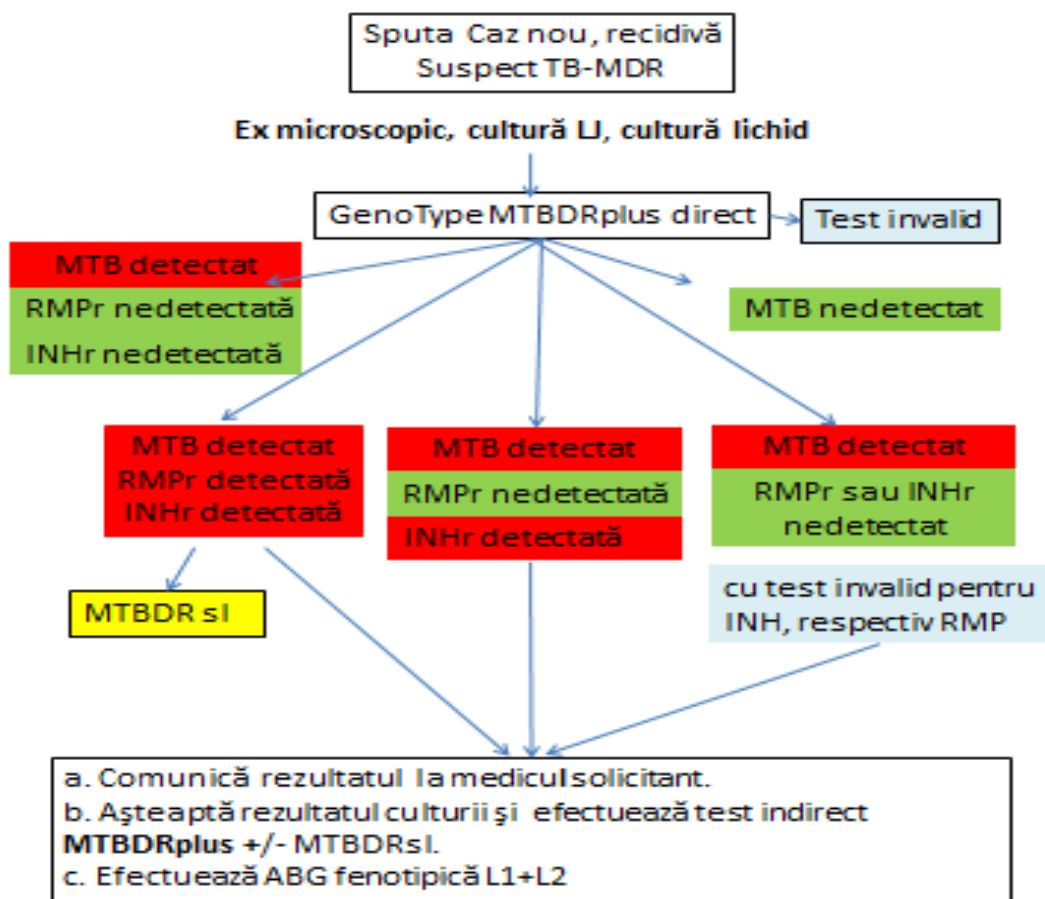


Figura 2. Algoritmul pentru sistemul GenoType

Pe parcursul efectuării testelor pot să apară probleme care pot afecta calitatea rezultatelor, de aceea trebuie cunoscute și prevenite sau corectate, în funcție de situație. (tabelul XIX)

Tabel XIX. Probleme care pot să apară și rezolvarea lor

Problema apărută	Etapa de lucru	Cauză posibilă	Rezolvarea problemei
Colorare neomogenă a stripurilor	hibridizare	Stripuri acoperite incomplet de soluțiile de reactivi în timpul etapelor de incubare.	Repetă hibridizarea
		Tavița de hibridizare incorect agitată.	
Fondul colorat puternic	hibridizare	Reactivii CON-C și/sau SUB-C nu au fost diluați corespunzător.	Repetă hibridizarea
		Etape de spălare necorespunzătoare.	
		Soluția de spălare a fost prea rece.	
Lipsă benzi sau benzi slabe (inclusiv CC)	hibridizare	Temperatura camerei prea scăzută sau reactivi neechilibrați termic.	Repetă hibridizarea
		Lipsa sau o cantitatea prea mică de CON-C și/sau SUB-C.	
Lipsa benzi sau benzi slabe (cu excepția zonei CC)	extracția ADN	Calitatea ADN-ului extras nu permite o amplificare eficientă.	Repetă extracția.
	preparare mix	Mixurile de amplificare (AM-A și AM-B) au fost inversate, ori adăugate în cantități greșite, nu au fost agitate corespunzător.	Prepară un nou mix și repetă testul.
	hibridizare	Temperatura de incubare prea ridicată.	Repetă hibridizarea
Rezultate neașteptate	etapa pre-analitică	Condiții necorespunzătoare pentru recoltarea, stocarea, transportul sau pregătirea probei.	Solicită altă probă și repetă testarea
	extracția ADN	Erori în timpul extracției ADN.	Repetă extracția .
		Contaminarea ADN extras cu ADN extras sau amplificat anterior.	
		Folosirea unor culturi mixte.	
	amplificare	Contaminarea reactivilor de extracție. În acest caz, controlul negativ (ENC) arată benzi suplimentare în afară de benzile CC și AC.	Repetă amplificarea folosind reactivi proaspeți.
			Atenție la pipete!
	hibridizare	Temperatura de incubare necorespunzătoare.	Repetă hibridizarea
		Hybridization Buffer și/sau Stringent Wash Solution necorespunzător preîncălzite sau agitate.	

Problema apărută	Etapa de lucru	Cauză posibilă	Rezolvarea problemei
		Contaminarea probelor alăturate prin stropirea cu soluția de hibridizare.	
	hibridizare	În funcție de cantitatea ADN amplificată folosită în condiții specifice de reacție, apare colorare puternică și rapidă a benzilor.	Înterupe incubarea substratului îndată ce benzile devin evidente pentru prevenirea apariției benzilor de cross-hibridizare
Lipsă semnal în zona TUB		Culturi mixte de <i>M tuberculosis</i> și specii NTM, zona TUB rămâne cu semnal slab/lipsă din cauza competiției dintre diferitele specii bacteriene.	Reia cultura pentru a obține cultură pură.

Pentru fiecare lot de reactivi recepționați în laborator se verifică dacă producătorul a adus îmbunătățiri (fișa de alertare este inclusă în cutia cu reactivi), etapele de lucru fiind obligatoriu adaptate recomandărilor din instrucțiunea de lucru actualizată de către producător.

GeneXpert MTB-Rif

GeneXpertMTB/Rif este un sistem genetic pentru detectarea simultană a MTB și a rezistenței la RMP (prin mutații în gena *rpoB*) prin metoda de amplificare semi-cantitativă în lanț în timp real (RT-PCR).³⁶

Este un sistem complet integrat, cu cartușe de unică folosință în care proba pregătită în prealabil este introdusă și procesată în aparat.

Cartușul conține sisteme de control a procesării probei:

- SPC: (sample processing control), control pentru prelucrarea probei care verifică prelucrarea adecvată a ei și monitorizează prezența inhibitorilor reacției de polimerizare în lanț (PCR)
- PCC: (probe check control), verifică rehidratarea reactivilor, nivelul de umplere al cartușului, integritatea probei și stabilitatea colorantului.

Primerii (secvențe de ADN) conținută amplifică porțiunea „core” de 81 perechi de baze a genei *rpoB*. Testul are capacitatea să facă distincție între secvențele de tip sălbatic (fără mutații) și secvențele cu mutații din această regiune.

Considerații generale

- Înainte de a începe folosirea echipamentului trebuie să te asiguri că ai citit instrucțiunile de lucru și ai înțeles informațiile oferite în timpul instruirii.
- *Nu este permis lucrul fără instruire prealabilă.* Se pot produce daune care conduc la pierderea garanției.
- Prelucrarea tuturor probelor clinice trebuie să se facă respectând standardele de biosiguranță.
- Consideră toate sputele, inclusiv cartușele folosite, ca potențial infecțioase.
- Folosește echipament personal de protecție (halat, mănuși) când mănuiiești sputa sau reactivii.
- Spală mâinile cu grijă după mănuierea sputei sau reactivilor.
- Toate mesele trebuie decontaminate la sfârșitul lucrului sau după scurgerea sau prelingerea din cartuș cu dezinfectant tuberculucid (hipoclorit de sodiu 1% urmat de stergere cu alcool 70%).
- Nu deschide capacul cartușului decât pentru introducerea probei.
- Nu refolosi cartușele.
- Îndepărtează cartușele folosite conform procedurii de colectare a materialului infecțios.

Echipament și materiale

- Sistem GeneXpert Dx echipat cu GX2.1 software/computer/printer/cititor manual de cod de bare (Cepheid Inc, Sunnyvale, USA) (Cat Item N° GXIV-4N1-6).
- CPM (cabinet de protecție microbiologică) de clasa II
- Kitul Xpert MTB/RIF conține câte 10 cartușe ambalate împreună:
 - Păstrează cartușele și reactivii Xpert MTB/RIF la 2-28°C.
 - Nu deschide cartușele decât atunci când ești pregătit să faci testul.
 - Folosește cartușul în maxim 30 de minute după ce i-ai deschis capacul.
 - Cartușele sunt stabile până la 7 zile după deschiderea pachetului (notează data deschiderii pe ambalaj)
- Reactivul furnizat în kit conține câte 8 ml pentru fiecare cartuș. Soluția este limpede dar poate fi de la incoloră până la galben auriu.
- Folosește marker permanent pentru numerotarea cartușelor.
- Folosește pipete sterile ambalate individual pentru prelucrare.
- Încarcă cartușul cu pipetă de unică folosință furnizată odată cu kitul, marcată pentru volumul minim de pipetat (2 ml).
- Sputa trebuie să fie recoltată în recipient steril cu capac înfiletat.
- Toate materialele folosite și sputa rămasă se îndepărtează urmând procedura de îndepărtare a deșeurilor infecțioase.
- Trebuie planificată prelucrarea ținând cont că pot rula la un moment dat maxim 4 probe, cu durata testului de 2 ore.
- Datele pacientului se introduc în fișa de lucru.

Procedura de lucru

a. Sputa expectorată

- Ia 1ml spută din recipientul de colectare cu pipetă sterilă și pune-l în tubul de lucru; după folosire pune-o în recipientul de colectare a materialului infecțios.

- Adaugă cu altă pipetă reactivul din kit în proporție de 2:1 (2 ml reactiv la 1 ml spută). Se pot prelucra 2-3 ml spută, dar trebuie să fie respectată proporția reactiv: spută.
 - Strânge bine dopul tubului de lucru (să nu se scurgă).
 - Agită tubul prin inversare de 10-20 x.
 - Incubează la temperatura camerei până la 15 minute.
 - În perioada incubării agită cel puțin odată tubul, ca mai sus.
 - La sfârșitul incubării sputa trebuie să fie lichefiată complet, fără fragmente sau filamente vizibile.
 - Scrie pe cartuș, cu marker, numărul de registru (un cartuș pentru fiecare probă).
 - Scrie la baza frontală a tubului sau pe lateral, dar *niciodată pe capac sau peste codul de bare*.
- b. *Sediment (aspirat gastric, aspirat bronșic, lavaj bronșic, spută indusă)*
- proba clinică trebuie centrifugată pentru concentrare, la 3000x g, 20 minute.
 - Decantează supernatantul și reține 1 ml (sau 0,5 ml).
 - Ia 1ml din sediment cu pipetă sterilă și pune-l în tubul de lucru; după folosire pune pipeta în recipientul de colectare a materialului infecțios
 - Adaugă cu altă pipetă reactivul din kit în proporție de 3:1 (3 ml reactiv la 1 ml sediment. Dacă se prelucrează 0,5 ml sediment, se adaugă 1,5 ml reactiv, dar trebuie să fie respectată proporția dintre reactiv și sediment.
 - Strânge bine dopul tubului de lucru (să nu se scurgă)
 - Agită tubul prin inversare de 10-20 x.
 - Incubează la temperatura camerei până la 15 minute.
 - În perioada incubării agită cel puțin odată tubul, ca mai sus.
 - La sfârșitul incubării sputa trebuie să fie lichefiată complet, fără fragmente sau filamente vizibile
 - Scrie pe cartuș, cu marker numărul de registru (un cartus pentru fiecare probă).
 - Scrie la baza frontală a tubului sau pe lateral, dar *niciodată pe capac sau peste codul de bare*.

Prepararea cartușului

Note:

- a. *introdu cartușul în aparat în maxim 30 de minute după deschiderea lui și adăugarea probei.*
 b. *când mânuiești cartușul nu atinge niciodată partea din spate. Ține-l din laterale.*

Procedura de lucru

- Folosește pipetă sterilă furnizată cu kitul, aspiră proba lichefiată astfel ca meniscul format să depășească marcajul minim. *Nu se procesează proba în continuare dacă volumul este insuficient - sub marcajul de pe pipetă!*
- Evită atingerea pipetei sterile. Deschide ambalajul pipetei la extremitatea cu pară și scoate atent pipeta. Păstrează ambalajul pipetei.
- Deschide capacul cartușului și transferă lent proba în cartuș prin orificiul de încărcare din colțul din dreapta, față. Minimizează riscul de formare de aerosoli prin pipetarea lentă.
- Pune pipeta cu atenție în ambalajul de plastic și descarc-o în recipientul de colectare a materialului infecțios.
- Închide ferm capacul cartușului.

- Proba lichefiată rămasă după umplerea cartușului poate fi păstrată până la 12 ore la 2-8°C, pentru repetarea testului, dacă se consideră necesar. Pentru aceasta trebuie să ne asigurăm că a fost prelucrată cantitate suficientă din proba primară, adică cel puțin 2 ml spută.
- *Important:* Asigură-te că introduci cartușul în aparat în maxim 30 de minute după adăugarea probei și că ai încărcat minim 2 ml de probă prelucrată.

Pornirea testului

Important: Înainte de începerea testului asigură-te că sistemul este conectat la o sursă de curent neîntreruptibilă (UPS).

- Pornește instrumentul
- Pornește computerul, cu parola “xxxx”, în fereastra cphd.
- Dă dublu clic pe pictograma “GeneXpert Dx” de pe ecranul monitorului.
- În fereastra GeneXpert Dx dă clic pe “**Create Test**” și apare fereastra de dialog “Scan Cartridge Barcode”. Dă cancel sau ignoră introducerea manuală și scanează codul de bare prin poziționarea scannerului în zona centrală a acestuia.
- Scrie numărul probei în fereastra “Sample ID” și asigură-te că este corect.
- Dă clic pe “Start test”
- Se aude un clinchet și la unul dintre module apare lumină verde. Deschide ușița respectivă și introdu cu grijă cartușul.
- Închide ferm ușița modulului, încât să auzi un click.
- Lumina verde nu mai pâlpâie ci rămâne aprinsă atunci când începe testul. La terminarea testului lumina verde se stinge.
- Se introduc toate cartușele urmând aceiași pași. “Create test”.....

Un test complet durează 1 oră și 55 minute.

Rezultatul este generat automat, la terminarea testului.

- Așteaptă până când sistemul deblochează ușița la sfârșitul testului, deschide-o și îndepărtează cartușul folosit.
- Depune cartușul în recipientul pentru colectarea materialului infecțios.
- Folosește formularul tipărit sau transcrie rezultatul în caietul de lucru pentru Xpert și introdu rezultatul în buletinul de solicitare, semnează, parafează, datează.

Controlul calității

Fiecare cartuș are inclus un **control pentru prelucrarea probei** (Sample processing control - SPC) și **control pentru probă** (Probe Check control - PCC) care ne asigură că proba a fost prelucrată corect.

SPC = control pentru prelucrarea probei

- verifică prelucrarea adecvată a MTB.
- ar trebui să fie pozitiv pentru un produs negativ sau poate fi negativ sau pozitiv la un produs pozitiv.
- se consideră că testul de control al probei a trecut atunci când este validat criteriul de acceptare. Testul este “INVALID” dacă SPC nu este detectat în testul negativ.

PCC = control pentru probă

- înainte de începerea reacției PCR sistemul măsoară semnalul fluorescent al probei pentru monitorizarea hidratării particulelor, umplerea tuburilor de reactivi, integritatea probei și stabilitatea colorantului.
- Testul este trecut dacă întrunește criteriile de acceptare.

Erori

- MTB-NO RESULT
- SPC-NO RESULT
- PCC-NA (ne aplicabil)

Motive pentru repetarea probei

Repetă testul folosind un cartuș nou dacă:

- rezultatul “INVALID” indică faptul că testul SPC de **control pentru prelucrarea probei** nu a fost trecut.
- Apare eroarea SPC când proba nu a fost prelucrată corect sau PCR a fost inhibată.
- “ERROR”: mesaj care indică eșuarea controlului pentru probă (PCC) și testul s-a întrerupt datorită umplerii necorespunzătoare a cartușului, sau a fost detectată o problemă de integritate a reactivilor, sau limita de presiune a fost depășită sau modulul GeneXpert a eșuat.
- “NO RESULT”, lipsa unui rezultat, indică faptul că au fost colectate prea puține informații. De exemplu, operatorul a oprit testul care era în desfășurare.

Interpretarea rezultatelor GeneXpert MTB/RIF

- Fiind un test bazat pe detectarea ADN-ului MTB se adresează doar cazurilor noi de TB. Trebuie să ne asigurăm că nu se prelucrează probe la monitorizarea tratamentului.
- Rezultatele sunt interpretate de sistemul GeneXpert Dx prin măsurarea semnalului fluorescent și calculul algoritmilor care apar în fereastra “**View Results**”.
- Cea mai mică valoare Ct (numarul ciclurilor de amplificare) la pornire reprezintă cea mai mare concentrație de ADN a matricei; cea mai mare valoare a Ct reprezintă cea mai mică concentrație de ADN a matricei.

MTB DETECTED = Mycobacterium tuberculosis detectat

- Dacă este detectat ADN țintă în probă, rezultatul MTB afișat va fi “High, Medium, Low sau Very Low”, respectiv în cantitate mare, medie, mică sau foarte mică, depinzând de valoarea Ct a țintei MTB prezentă în spută (tabel XX).

Tabel XX. Valorile rangului Ct corespunzătoare rezultatelor MTB afișate

Rezultat MTB	Rangul Ct
High = mare	<16
Medium = mediu	16-22
Low = mic	22-28
Very Low = foarte mic	>28

- Când MTB este detectat, rezultatele pentru RMP pot fi:
 - *Rezistență la RMP DETECTATĂ* (Rifampicin resistance DETECTED): a fost detectată mutație în gena *rpoB* în intervalul valid de variație a Ct.
 - *Rezistență la RMP NEDETECTATĂ* (Rifampicin resistance NOT DETECTED): nu a fost detectată nici o mutație în gena *rpoB*.
 - *Rezistență la RMP INDETERMINATĂ* (Rifampicin resistance INDETERMINATE): concentrația MTB a fost foarte mică și rezistența nu poate fi detectată.

MTB NEDETECTAT (MTB NOT DETECTED)

- Ținta ADN - MTB nu este detectată. SPC are criterii de acceptare.
 - MTB NOT DETECTED - MTB NEDETECTAT - ținta AND- MTB nu este detectată.
 - SPC - testul de verificare trecut dar variația Ct și valoarea finală sunt sub nivelul minim stabilit.
 - PCC – testul de verificare trecut: toate rezultatele verificate au fost acceptate.

RIF NEDETECTAT (RIF NOT DETECTED)

- Ținta ADN pentru Rif (RMP) nu este detectată, SPC – are criteriu de acceptare.
 - Rifampicină nedetectată (RIF NOT DETECTED) - ținta ADN pentru RMP nu este detectată
 - SPC - test trecut dar variația Ct și valoarea finală sunt sub nivelul minim stabilit.
 - PCC - testul de verificare trecut: toate rezultatele verificate au fost acceptate.

INVALID - nu se poate lua în considerare

- Prezența sau absența MTB nu poate fi determinată. Repetă testul din alt produs. SPC nu întrunește criteriile de acceptare, proba nu a fost prelucrată corect sau PCR este inhibată.
 - MTB INVALID- prezența sau absența ADN- MTB nu poate fi determinată.
 - SPC-nu a trecut testul, a eșuat; rezultatul țintei pentru MTB este negativ și Ct pentru SPC nu se situează în limitele de acceptare.
 - PCC- a trecut testul; toate verificarile pentru probă au trecut testul.

Limitările testului de diagnostic in vitro

- Testele se efectuează folosind această procedură și instrucțiunile din kituri.
- Calitatea rezultatelor depinde de recoltarea corectă a sputei, mânuirea și păstrarea ei.
- Rezultatul pozitiv nu indică neapărat MT viabil. Este doar un test prezumptiv pentru prezența MT și a rezistenței la RMP.
- Rezultatul poate fi afectat de terapie anti-TB precedentă, sau terapie cu efect asupra micobacteriilor.

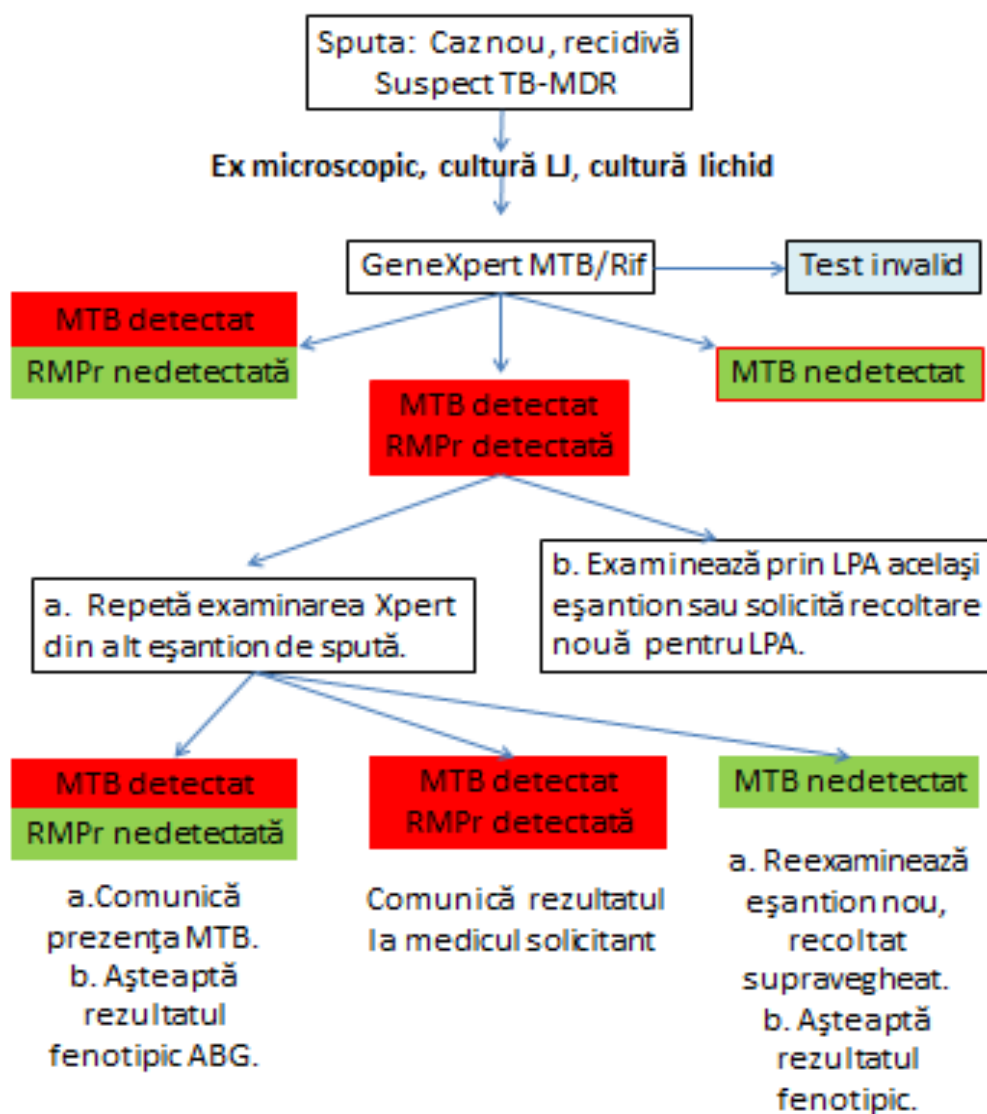


Figura 3. Algoritmul pentru sistemul GeneXpert MTB-Rif

6. Asigurarea calității

Asigurarea calității este un proces continuu care are ca scop îmbunătățirea și menținerea performanțelor laboratorului¹⁵.

Componentele unui program de asigurare a calității sunt:

- controlul intern al calității
- control extern al calității, comparare între laboratoare
- îmbunătățirea calității

Existența unui **sistem de asigurare a calității** garantează că rezultatele oferite de laborator sunt exacte, de încredere și reproductibile.

Laboratorul trebuie să monitorizeze toate activitățile și să păstreze înregistrări referitoare la acestea.

Controlul calității constituie parte integrată în activitatea laboratorului și este în responsabilitatea tuturor celor care lucrează în laborator.

Pentru *aprecierea tendințelor*³⁷ în privința performanțelor laboratorului, acesta trebuie să-și monitorizeze și analizeze periodic *indicatorii de calitate*, cu referire la ținta propusă.

Un program de asigurare a calității nu se poate derula fără **personal** suficient numeric, instruit, interesat și motivat, care folosește corect procedurile de lucru recomandate, care își recunoaște greșelile și acceptă să le corecteze, când activitatea din laborator se desfășoară în atmosferă de calm și bună-înțelegere, fără stres.

În fiecare laborator trebuie să existe scrise și accesibile toate **tehnicele de lucru** corespunzătoare nivelului de competență a laboratorului.

Toate laboratoarele trebuie să respecte tehnicile de lucru recomandate și să facă dovada participării la controlul extern al calității pentru toate tehnicile și metodele folosite.

ANEXA. Prepararea reactivilor

1. Metoda de decontaminare cu hidroxid de sodiu (metoda Petroff modificată)

Materiale:

- dezinfectant tuberculicid: etanol 70%
- tuburi de 10 – 12 ml, 50 ml cu capac cu filet, în funcție de dimensiunea cuvelor centrifugii
- soluție sterilă de NaOH 4%
- soluție sterilă de HCl 8% sau KH_2PO_4 15%
- balanță analitică
- vortex
- stative adecvate pentru tuburi
- centrifugă cu răcire, cu rotor pentru tuburi de 10 – 12 ml, sau 50 ml
- ceas de laborator
- pipete din material plastic, de unică folosință, sterile, ambalate individual, de 3 ml
- plită pentru uscat lame
- etichete pentru tuburi
- marker permanent
- lame pentru microscop 26x76x1mm, cu un capăt mățuit, curate și degresate

Reactivi ³:

- *Soluție de NaOH 4%.* Se dizolvă 4 g NaOH în 100 ml apă distilată și se sterilizează prin autoclavare timp de 30 minute la 121°C.
- *Soluție de HCl 8%.* Se diluează 8 ml de acid clorhidric în 92 ml apă distilată (prin turnarea acidului în apă și nu invers!). Dacă se folosește metoda cu centrifugare, se poate neutraliza cu fosfat monopotasice (KH_2PO_4) în soluție 15% (15 g KH_2PO_4 în 85 ml apă distilată).
- *Soluție de albastru de bromtimol (indicator).* Albastrul de bromtimol se prepară adăugând 0,1 g albastru de bromtimol la 3,2 ml sol. NaOH N/2 și 250 ml apă distilată. Soluția de NaOH N/2 se prepară amestecând 1 ml NaOH 4% în 19 ml apă distilată. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 30 minute. Se păstrează în sticlă brună. Culoarea albastră indică pH alcalin culoarea galbenă indică pH acid, iar o culoare galben-verzuie indică pH neutru. Soluția de albastru de bromtimol poate fi înlocuită cu soluție de roșu fenol (8 mg roșu de fenol se dizolvă în 20 ml NaOH 4% și se adaugă apă distilată până la 1000 ml). Culoarea roșie indică pH alcalin; culoarea galbenă persistentă indică pH acid.

Dacă există centrifugă conformă, cu cuve pentru tuburi Falcon de 50 ml se recomandă utilizarea acestora cu folosirea întregii probe clinice colectate și, implicit, recuperarea unei cantități mai mari de bacili.

2. Metoda de decontaminare NALC – NaOH²⁰

Materiale

- dezinfectant tuberculicid: etanol 70%
- tuburi Falcon de 50 ml, gradate, cu capac cu filet, sterile
- N-acetil L-cisteină (NALC), pulbere
- soluție NaOH 4%
- citrat de sodiu soluție 2,9%
- tampon fosfat, pH 6,8
- balanță analitică
- vortex
- stative pentru tuburi de 10-12 ml, 50 ml
- centrifugă cu răcire și rotor pentru tuburi de 10-12 ml sau 50 ml
- ceas de laborator
- pipete de plastic, de unică folosință, sterile, ambalate individual, de 3 ml
- pH metru
- plită pentru uscat lame
- etichete pentru tuburi
- marker permanent
- agitator plan

Soluție de NaOH 4%.

- Dizolvă 4 g NaOH în 100 ml ADS și sterilizează prin autoclavare timp de 20 minute la 115°C. Etichetează.

Soluție citrat de sodiu 2,9%

- Dizolvă 2,9g citrat de sodiu hidratat (2H₂O) în 100 ml ADS. Sterilizează prin autoclavare timp de 20 minute la 115°C. Etichetează.

Pentru lucru, cele două soluții se amestecă în cantități egale și se adaugă în ziua de lucru cantitatea necesară de NALC pulbere, în funcție de numărul de produse de prelucrat, astfel:

Volum de lucru final	NaOH 4%	Citrat de sodiu 2,9%	NALC (g)
50 ml	25 ml	25 ml	0,25
100 ml	50 ml	50 ml	0,5
200 ml	100 ml	100 ml	1

NALC în soluție este instabil și trebuie folosit în ziua preparării. Cantitatea nefolosită se îndepărtează.

Bibliografie

1. Mycobacteriology laboratory manual. GLI. First edition, April 2014, StopTB Partnership.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Mastering the basics of TB control: Development of a handbook on TB diagnostic methods. Stockholm: ECDC; 2011.
- 2a. I Solovic, J Jonsson, M Korzeniewska- Kosela, D I Chiotan, A Pace-Asciak, E Slump, R Rumetshofer, I Abubakar, S Kos, P Svetina-Sorli, W Haas, T Bauer, A Sandgren, M J van der Werf www.eurosurveillance.org
- 2b. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. Stockholm: ECDC; 2015.
3. Diaconescu C, Homorodean D, Popa MI, Banica D, coord. Bercea O- Ghid de diagnostic bacteriologic al tuberculozei, Bucuresti, 1998.
4. Daniela Homorodean, Olga Moldovan, Daniela Diculencu, Grația Chiriac, Ionela Muntean, revizie tehnică de specialitate IM Popa. Îndrumar de tehnici de laborator de bacteriologie BK- București 2005, ISBN 973-0-04173-3
5. Ghid metodologic de implementare a programului național de prevenire, supraveghere și control al tuberculozei. București, 2015. ISBN 978-973-139-325-4.
- 5a. Meenu Singh, N.V. Ahsan Moosa, Lata Kumar and Meera Sharma. Indian Pediatrics 2000;37: 947-951
6. Lumb R., Van Deun A., Bastian I, Fitz-Gerald M. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis by Sputum Microscopy. The handbook. Global edition. 2012
7. TB diagnostics and laboratory straightening – WHO policy, 2007. Proposed reduction of number of smears for the diagnosis of pulmonary TB: background document. www.who.int
8. Ghid de reglementari pentru Transportul Substantelor Infecțioase 2011 – 2012. WHO/HSE/IHR/2010.8
9. IATA Packing Instruction 650 – Biological Substances, Category B (http://www.iata.org/NR/rdonlyres/9C7E382B-2536-47CE-84B4-9A883ECFA040/0/Guidance_Doc62DGR_50.pdf)
10. DOT 49 CFR Parts 171-180 (http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text-idx?c=ecfr&tpl=/ecfrbrowse/Title49/49cfrv2_02.tpl)
11. DOT Pipeline and Hazardous Materials Safety Administration: How to transport infectious substances (https://hazmatonline.phmsa.dot.gov/services/publication_documents/Transporting.Infectious.Substances.Safely.pdf)
12. Vessel Sanitation Program Operations Manual 2005 (<http://www.cdc.gov/nceh/vsp/operationsmanual/OPSTManual2005.pdf>)
13. I.N. de Kantor, S. Jae Kim, T. Frieden, A. Laszlo, F. Luelmo, P-Y. Norval, H. Rieder, P. Valenzuela, K.Weyer. Laboratory services in tuberculosis control. Organization and management. Part I. WHO/TB/98.258
14. Tuberculosis laboratory biosafety manual. WHO/HTM/TB/2012.11
15. SR EN ISO 15189. Laboratoare medicale- cerințe pentru calitate și competență. ASRO.
16. De Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval P-Y, Rieder H, Valenzuela P, Weyer K. Laboratory services in tuberculosis control, part II: Microscopy, WHO/TB/98.258, 1998

17. WHO. Policy statement on fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis. Geneva, 2010.http://www.who.int/tb/laboratory/policy_statements/en/
18. Vincent Levy-Frebault V, Portaels F, Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species, *Int. j. of Systematic Bacteriology*, Apr, 1992, 315-323
19. Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology. A guide for the level III laboratory, 1985, Atlanta Georgia.
20. Cornaglia G., Courcol R., Herrmann J-L. et al. European Manual of Clinical Microbiology. ESCMID, ed 1, 2012.
21. Daniela Homorodean, Olga Moldovan, Mihaela Stoian, Mihaela Brojboiu, Grația Chiriac, Ionela Sorina Muntean, Domnica Ioana Chiotan, Iuliana Nicolae, Constantin Marica, Nicolae Galie. Organizarea și managementul laboratorului de micobacteriologie. București 2008. ISBN: 978-973-0-05558-0
22. Murray P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology, vol. I, ed. 9, 2007. American Society of Microbiology, Washington D.C.
23. Francis Varaine, Michael L. Rich. Tuberculosis. Practical guide for clinicians, nurses, laboratory technicians and medical auxiliaries, 2013, Medicins sans Frontieres and Partners in Health.
24. De Kantor IN, și col-Laboratory services in tuberculosis control, part III: Culture, WHO/TB/98.258, 1998
25. K.M. Kam. Laboratory issues in the context of MDR TB. Malaysia, 2007.
26. WHO. Policy Framework for Implementing New Tuberculosis Diagnostics. March 2010. <http://www.who.int/>
27. R.Brown. Trek diagnostic systems. The new energy in microbiology.
28. <http://www.publicbookshelf.com>
29. Hyeon-Seop Byeon¹, Mi Jung Ji, Shin-Seok Kang, Sang Woo Kim, Seung-Cheol Kim, Song-Yong Park, Geehyuk Kim, Jiro Kim, Jang-Eun Cho, Bok Kyung Ku, Jae-Myung Kim, Bo-Young Jeon. Performance of the SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test for quick confirmation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals. *J Vet Sci* 2015, 16(1), 31-35.
30. Mi Young Park, Young Jin Kim, Sang Hyun Hwang, Hyoung Hoi Kim, Eun Yup Lee, Seok Hoon Jeong, Chulhun L. Chang. Evaluation of an Immunochromatographic Assay Kit for Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*, Feb. 2009, Vol. 47, No. 2: 481–484.
31. Dominguez J, EC Boetger, D Cirillo, F Cobelens, KD Eisenach, S Gagneaux, D Hilleman, R Horsburgh, B Molina-Moya, S Nieman, E Tortoli, A Whitelaw, C Lange. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST_TB consensus statement. *Int J Tuberc Lung Dis* 20(1):24-42.
32. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis – 4th ed. WHO/HTM/TB/2009.422
- 32a. M. LIGOZZI, E. PELOSI and R. FONTANA. Development of a rapid method for quantitative evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* growth based on competitive polymerase chain reaction-technical note. *J. Med. Microbiol.* - Vol. 47 (1998), 933-936
33. World Health Organization. Policy statement. Molecular line probe assay for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant (MDR) TB. Geneva, 2008.

- 33a. WHO treatment guidelines for drug resistant tuberculosis-2016 update, WHO/HTM/TB/2016.04.
34. Marinus Barnard, Linda Parsons, Paolo Miotto, Daniella Cirillo, Knut Feldmann, Cristina Gutierrez, Akos Somoskovi. Molecular Detection of Drug-Resistant Tuberculosis By Line Probe Assay. Laboratory Manual for Resource-Limited Settings. FIND, 2012. www.finddiagnostics.org
35. IFU-3174-01/02.2015. GenoType MTBDRsl. www.hainlifescience.com
36. Procedură dezvoltată de FIND pentru adoptarea și folosirea în laboratoarele TB. Xpert MTB-Rif TB 06-03_V1.0.doc
37. New technologies for tuberculosis control. A framework for their adoption, introduction and implementation. WHO/HTM/STB/2007.40