

УЗИМАЊЕ И СЛАЊЕ УЗОРАКА НА МИКРОБИОЛОШКИ ПРЕГЛЕД

Др Душан Мишић

Процедура лабораторијске дијагностике инфективних обољења може се слободно рећи почиње узорковањем патолошког материјала од оболелих јединки и достављањем узорака у микробиолошку лабораторију. Познато је да се од живих болесних животиња на микробиолошки преглед могу да шаљу брисеви ока, коже, уха, грла, носа, препуцијума, вагине, уретре, цервикса материце, ректума, затим крв, крвни серум, урин, млеко, сперма, спутум, фецес, цереброспинална течност, пунктати телесних шупљина, гној, длака, скарификат коже, нокти, канџе, биоптати ткива и други. Од угинулих животиња на преглед могу да се шаљу паренхиматозни органи (цели органи или делови органа), цео леш (уколико је животиња мала), садржај телесних шупљина, део мишићног ткива и други. Тачна и брза детерминација узрочника у лабораторији могућа је само уколико је узет прави узорак, у право време и ако је транспортован на одговарајући начин до лабораторије. У супротном, значајно се отежава и продужава време трајања лабораторијске процедуре и налаз може да буде лажно негативан или лажно позитиван, а то за последицу може да има угинуће животиње или читавог запата. Да би избегла грешке, лица која узоркују материјал за микробиолошки преглед, треба да се придржавају следећих принципа:

- Узорковати материјал пре почетка антибиотске терапије или најмање 3 дана након завршене терапије;
- Узорак узети у акутној фази болести (уколико је уопште могуће);
- Опрати и дезинфиковати руке пре и после узорковања материјала;
- Узорак мора да одговара врсти обољења на које се сумња. На пример, спутум је одговарајући узорак уколико се сумња на пнеумонију, не пљувачка. Брис тонзила је одговарајући узорак код сумње на тонзилитис, не брис корена језика, меког или тврдог непца и слично. Овај принцип мора да буде испоштован без обзира што је понекад веома тешко узорковати материјал због агресивности или узнемирености животиње.
- Узорковани материјал мора да буде смештен у одговарајућу стерилну посуду.
- Посуда са узорком мора да буде добро затворена како не би дошло до контаминације материјала током транспорта.
- Узорак мора да буде достављен у лабораторију у најкраћем временском року.

Осим поштовања наведених принципа, потребно је да се води рачуна и о томе да узорак буде узет у довољној количини, због евентуалних квантитативних микробиолошких анализа (укупан број бактерија у узорку). У овом тексту у најкраћим цртама изнећемо правила везана за најчешће врсте узорака који се достављају у лабораторију Катедре за микробиологију, Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

Нормална флора – микробиом (микробиота)

Термин *нормална* или *физиолошка флора* односи се на бактерије које насељавају неке делове организма животиња и људи и ту су перманентно присутне.

Микроорганизми нормално настањују кожу, нос, ждрело, дебело црево, слепо црево и гениталне органе – препуцијум и вагиналну слузницу као и уретрални канал. Нови назив за физиолошку флору је *микробиом*. Одређене врсте квасаца су такође припадници микробиома (*Candida albicans*), док се вируси се не сматрају припадницима микробиома, мада могу да буду присутни код јединки са асимптоматском инфекцијом. Број и врста микроорганизама микробиома разликује се у зависности од регије организма, од врсте животиња и њиховог начина исхране (месоједи, биљоједи, сваштоједи) али и од старости јединке (сисинчад, одрасле јединке). Утврђено је да у цревима људи, када се одузме сав цревни садржај са цревним соковима, остаје око 1 до 1,2 килограма бактерија. Или другачије речено, у цревном садржају у дебелом цреву код људи живи око 1 милијарде бактерија у једном граму садржаја. Иако микроорганизми насељавају већи део организма домаћина, одређени органи и регије су примарно стерилни. То су крв, паренхиматозни органи (јетра, слезина, бубрези) и нервни систем, мада се понекад и у њима могу наћи микроорганизми такозване *транзитне* (пролазне, налетне) микрофлоре. Микробиом може бити *нарушен* тј. *поремећен* (промењен) уколико домаћин узима антибиотике или неке друге лекове, код поремећаја исхране и неких обољења. Поремећај физиолошке флоре неког органа за последицу може имати поремећај функције тог органа као и смањену отпорност домаћина на инфекцију патогеним узрочницима. Не само то, код преживара је читав систем варења биљне хране, тачније разлагања целулозе, базиран на ензимској активности бактерија из микробиома, јер сисари, укључујући и преживаре, не излучују ензиме за разлагање целулозе. Другачије речено, уколико би преживарима био уништен цревни микробиом, они би угинули од глади.

Постоји значајна разлика између микроорганизама који припадају микробиому и *клицоноштва*. У извесном смислу, животиње и људи су увек клицоноше јер излучују микроорганизме – припаднике микробиома. Међутим, термин *клицоноша* се у медицинској терминологији односи искључиво на јединке које су инфициране *патогеним узрочницима* и излучују их у спољашњу средину, а тиме представљају извор инфекције за остале јединке из окружења.

Слично томе, постоји и значајна разлика између физиолошке флоре и *колонизације*. Термин *колонизација* односи се на насељавање домаћина новим микроорганизмима који иначе нису део микробиома или насељавање иначе стерилних органа припадницима микробиома. Након колонизације, може доћи до инфекције новим микроорганизмом или до његове елиминације. Колонизирана индивидуа је клицоноша. Ови појмови су дефинисани на овом месту из разлога што, практично свако живо биће на планети, а посебно сисари, представљају клицоноше, јер, путем излучевина или директним контактом преносе и шире бактерије припаднике микробиома које, у одређеним условима, код других јединки исте или других врста, могу да изазову инфекције.

Због изразито великог значаја микробиома код људи и животиња, у новијој литартури се микробиом сврстава у *органа* животињског и људског организма. Односно, микробиом је орган исто као што су јетра, бубрег, итд. Разлог за овакав приступ је доказ да живот без микробиома није могућ. Ово је одавно доказано у грани микробиологије која се зове *гнотобиологија* и која проучава живот, раст, развој, исхрану и имунолошка својства код микробиолошки потпуно *стерилних животиња*. Гнотобиологија је доказала да недостатак микроорганизама у организму животиње доводи неминовно до смрти те животиње. Животиње без микробиома не могу да варе храну, поремећена им је ресорпција и искоришћавање хранљивих материја, имунски систем им остаје неактиван и

неразвијен, већина унутрашњих органа, а нарочито црева, плућа и кожа таквих јединки имају тешко поремећену функцију и те животиње врло брзо умиру. Односно, могуће их је само вештачки одржавати у животу. Ово све заправо значи да, уколико би људи и животиње били стерилисани у микробиолошком смислу, живот би им био онемогућен и врло брзо би дошло до фаталног исхода.

Специфичности узимања узорака од живих (болесних) животиња

1. Брисеви

У микробиолошкој дијагностици брисеви се сматрају најнеадекватнијом врстом узорака из неколико разлога. Најпре, веома често долази до грешака приликом узимања брисева јер ветеринар због страха од агресивне и немирне животиње на брзину пређе брисем преко потпуно погрешног (неинфицираног) ткива или само овлаш дотакне оболело ткиво. Такође, методом узимања бриса није могуће захватити довољну количину узорка. Ово је важно с обзиром да микробиолошка процедура подразумева припремање размаза од достављених брисева, њихово бојење и микроскопирање. У зависности од микроскопског налаза директно у материјалу зависи и избор хранљивих подлога и режим инкубисања као што су температура, присуство CO₂, дужина трајања инкубисања и слично (на пример, налаз филаментозних и разгранатих штапића у размазу гноја указују на могуће присуство бактерија из родова *Actinomyces* или *Nocardia* због чега се подлоге са засејаним материјалом инкубишу најмање 7 дана, уместо рутинских 48 до 72 х). Могуће је да се због утрешка узорка за потребе припремања размаза, на хранљивим подлогама не појави пораст бактерија или гљивица. Стога се према правилима микробиолошких лабораторија из земаља ЕУ и САД, брисеви увек узимају у пару, без обзира које ткиво је у питању. Уколико се захтевају и посебна бојења, на пример по Ziehl – Neelsen или продужено бојење карбол-фуксином, као и за вирусолошку дијагностику, обавезно је истовремено узимање неколико брисева. Приликом узимања брисева рана важно је да се нагласи да се ивице и околина ране морају претходно дезинфиковати. Брис мора да се убади што дубље у рану и остави да одстоји неколико секунди како би се „натопио“ гнојем и ткивним соковима. Уколико се из ране крв или гној издвајају помоћу дрена у одређену посуду, погрешно је да се помоћу бриса узорак узима из самог дрена или посуде. Ово је важно да се нагласи због чињенице да су инфекције рана углавном изазване са више узрочника и да приликом стајања гноја у дрена или боци долази до прерастања материјала брзорастућим бактеријама, док спорорастући узрочници остају потиснути што може да доведе до погрешне лабораторијске дијагностике, а тиме и компликације процеса код пацијента. Сви брисеви, без обзира на врсту узоркованог материјала, морају да се доставе у лабораторију за најмање 2 до 4 сата од момента узорковања. Уколико то није могуће, брис треба да се потопи у стерилан физиолошки раствор или други транспортни медијум и чува у сопственој амбалажи на температури фрижидера најдуже 24 х. Код сумње на гљивична обољења коже изазвана дерматофитама, погрешно је узорковање бриса коже (иако се у лабораторије најчешће достављају управо брисеви коже). Код сумње на присуство дерматофита, потребно је да се узоркује длака (прамен, не неколико длачица) са ивица промењених делова коже. Скарификат коже је такође адекватан узорак за испитивање на присуство гљивица. С обзиром да гљивице не трпе исушивање, длака или скарификат морају да се доставе у лабораторију одмах након узорковања.

2. Урин

Под нормалним околностима, урин здраве животиње је стерилан. Међутим, нижи делови уретре као и кожа гениталија колонизовани су великим бројем врста бактерија од којих многе могу да изазову уринарне инфекције. Како је урин веома погодна средина за раст и размножавање бактерија, адекватно, асептично узорковање урина има нарочит значај у односу на друге врсте узорака. Увек се узима средњи млаз урина и узорак мора да се транспортује до лабораторије најкасније за 1 сат од момента узорковања. Дуже стајање узорка омогућиће евентуално присутним бактеријама да се и даље размножавају. У супротном, може да се добије погрешна слика о укупном броју бактерија по милилитру урина, што представља веома значајан податак за процену дали се ради о инфекцији или не. Стога је у ветеринарској медицини пожељније да се узорак урина узме приликом катетеризације или цистоцентезе јер је тада, знатно, смањена могућност контаминације. Осим тога, погрешно је да ветеринар дозволи власнику да сам узоркује урин од животиње из разлога што власници, најчешће из незнања, контаминирају урин тако што посудом за узорак дотичу друге делове тела животиње.

3. Фецес

За постављање тачне етиолошке дијагнозе инфективних дијареја, узорци фецеса треба да се узму у почетним фазама болести. За највећи број узрочника пролива код животиња, ректални брис је неприхватљив узорак. Фецес и урин не смеју да се мешају. Фецес не сме да се узоркује са пода или земље. Уколико се сумња на инфекцију *Salmonella* врстама потребно је да се узоркује најмање 5 грама фецеса пореклом од малих, односно 25 грама фецеса од великих животиња. Узорак фецеса мора да се достави у лабораторију у року од 4 сата након узорковања. Уколико се сумња на присуство *Campylobacter* или *Clostridium* врста, фецес мора да се достави у лабораторију најкасније за 1 сат, у супротном, за слање узорка мора да се користи транспортни медијум. Многи узрочници, који код животиња изазивају пролив не могу да се изолују из фецеса. Ради њиховог сигурног изоловања у лабораторију, обавезно, треба да се пошаље део црева са садржајем. На пример, код сумње на дизенетерију свиња, ради изолације узрочника *Brachyspira hyodysenteriae* на преглед се шаље део подвезаних танких црева са сацајем, а слично је и са неким *Campylobacter* врстама.

4. Крв и крвни серум

Пуна крв се узима код сумње на септикемију. Необично је важно да се пре вађења крви кожа животиње на месту вађења ошиша и дезинфикује. Крв не сме да се згруша након вађења јер у противном не може да се адекватно засеје на хранљиве подлоге. Због наведеног је потребно да се пре вађења крви у епрувету дода неко од антикоагулантних средстава. Потребно је скренути пажњу да нека средства попут натријум цитрата и EDTA нису прихватљиви антикоагуланси јер имају изражено антибактеријско деловање. Хепарин такође инхибише раст неких грам-позитивних бактерија и квасаца али је погодан уколико се пуна крв шаље на вирусолошку анализу. Најпогоднији антикоагуланс је натријум полиетанол сулфонат и на нашем тржишту се могу наћи стерилни системи за вађење крви (вакутанери) који садрже управо ово једињење. Забрањено је да се у лабораторију

донесе шприц са иглом којом је животињи извађена крв. Игла треба да се уклони одмах након вађења, а врх шприца може да се затвори загревањем на пламену.

Када се крв узима ради издвајања крвног серума и слања узорка на серолошку анализу, антикоагуланси не смеју да се додају, а крв не сме да се при узимању вади иглом у шприц, већ у посебне стаклене бочице. Узоркована крв не сме да буде хемолизирана!

5. Спутум

За изолацију узрочника који доводе до промена на доњим деловима респираторног система, једини прихватљив узорак је спутум, посебно уколико се сумња на *Mycoplasma* врсте. У највећем броју случајева од животиње, на жалост, није могуће узети ову врсту узорка. Донекле прихватљива замена за спутум је транстрахеални аспират (уколико је узет на адекватан начин).

СПЕЦИФИЧНОСТИ УЗОРКОВАЊА ОРГАНА УГИНУЛИХ ЖИВОТИЊА

Најчешће и најтеже грешке догађају се управо приликом узимања органа или делова органа уинулих или жртвованих животиња и њиховог слања у лабораторију. Најпре, обдукција уинулих животиња не сме да се обавља на месту уинућа (штала, двориште власника), јер може да дође до неизбежне контаминације органа који се шаљу на преглед. Ветеринар мора да има стерилне инструменте за рад као и стерилне заштитне рукавице. Са микробиолошког становишта, веома је погрешно рукама узимати или прегледати један органски систем (на пример црева и садржај црева животиње), а потом за микробиолошки преглед употребом истих рукавица узорковати органе других система (плућа, срце или јетра). Уколико се сумња на присуство анаеробних узрочника, веома је важно да се користи транспортни медијум и да се узорак не замрзава. Такође је важно да се узоркује материјал у правом тренутку (најкасније 1 до 2 сата након уинућа животиње). **Узорци органа намењени за микробиолошки преглед не смеју да се стављају у формалин!** Уколико се на преглед шаљу црева са садржајем, подвезивање мора да се уради на квалитетан начин, како током транспорта не би дошло до разливања садржаја. Материјал мора да се прописно запакује. На нашем тржишту могу да се нађу специјалне металне (лимене) посуде са поклопцем на завртање, а које су намењене управо за паковање микробиолошких узорка. Узорци органа пакују се најпре у мању посуду пластичну или стаклену која мора да буде стерилна и која се добро затвара. Затим се та посуду пакује у већу металну посуду која се такође добро затвара и поставља у трећу, металну посуду која се након завртања поклопца мора добро облепити. Између свих посуда мора да се убаца вата, папирна вата или стиропор, који могу да спрече евентуално разливање течности, уколико током транспорта дође до пробијања посуде са узорком. Из металних посуда материјал практично не може да се излије напоље чиме се спречава његова контаминација, као и могућност ширења инфективног агенса, уколико се ради о узрочнику зооноза (туберкулоза, антракс, листериоза). Посуда са узорцима или узорком мора јасно да се обележи налепницом на којој пише шта посуду садржи. Забрањено је да се материјал директно пакује у картонску амбалажу (кутије од лекова, кутије за ципеле) или најлонске кесе. Узорак у лабораторију мора да донесе ветеринар лично или овлашћени курир, а само изузетно власник животиње.

Остали узорци

За микробиолошку анализу најпогоднији су биоптати ткива и пунктати телесних шупљина, који се узимају на асептичан начин. Наведени узорци се због адекватног узимања веома ретко контаминирају, а могућност да се узму у већој количини обезбеђује сигурнију изолацију траженог узрочника.

Пропратни акт

Поред основних информација о власнику, врсти животиње и узорку, пропратни акт мора да садржи и информације о материјалу који је достављен на испитивање. На пример, није довољно да се нагласи да је у питању брис ране, него је потребно да се наведе да ли је рана убодна или уједна, да ли је на глави или екстремитету и слично. Када се шаљу органи на преглед, веома је важно да се нагласи када је материјал узоркован у односу на време угинућа животиње (одмах, након 1 сат, након 12 сати, након 3 дана). Најважнији податак у сваком пропратном акту јесте болест на коју се сумња, као и захтев ветеринара за посебним анализама (на пример, захтев за испитивање материјала на присуство узрочника гасних гангрена, на присуство узрочника туберкулозе и друго).

Транспорт до лабораторије

Идеално би било да се узорак у микробиолошку лабораторију достави одмах, без одлагања како би што пре почела процедура изолације узрочника. У пракси ово, на жалост, најчешће није могуће, како због непоклапања радног времена ветеринара и лабораторије тако и због удаљености локација са којих се узорак шаље. У таквим приликама важно је да се обрати пажња да не дође до следећих ситуација:

- Да материјал не прерасту брзорастући микроорганизми;
- Да не дође до угинућа микроорганизама због промене температуре или рН вредности;
- Да се не промени укупан број микроорганизама (погрешна квантификација узрочника);
- Да се узорци који садржи анаеробе не изложе деловању кисеоника;
- Да се узорци не згрушају;
- Да се узорци не контаминирају.

Наведене ситуације избегавају се потапањем узорака у одговарајуће транспортне медијуме и њиховим чувањем на одговарајућим температурама. Како је већ речено, већину брисева довољно је потопити у стерилни физиолошки раствор или PBS пуфер. Постоје изузеци, на пример, цервикални брис кобила са сумњом на присуство *Taylorella equigenitalis* обавезно се потапа у Amies-karkoal транспортни медијум. Узорци фецеса или органа са сумњом на присуство анаеробних узрочника потапају се у тиогликолатни медијум. На страном тржишту се у последњих неколико година могу наћи специјални транспортни медијуми за

конзервисање узорка. У таквим медијумима узрочници се не размножавају али остају витални, тиме се обезбеђује тачна и прецизна процена броја узрочника у узорку. Ветеринар може да контактира лабораторију у коју жели да достави узорак и да наручи одређену количину транспортног медијума пре самог узорковања материјала.

На крају, уместо закључка, набројаћемо најчешће разлоге због којих лабораторија може да одбије примање узорка:

- Подаци из пропратног акта не одговарају стању и врсти достављеног узорка (наведено је да се достављају плућа, у амбалажи се налази јетра или слично).
- Амбалажа у којој се налази узорак је пропустљива или је поломљена и садржај цури.
- Шприц са иглом помоћу које је извађена крв (игла није уклоњена након вађења).
- Фецес помешан са урином животиње.
- Узорак сумњив на присуство анаероба који није заштићен од кисеоника.
- Сумња се да је животиња угинула од анаеробне инфекције, а узорак од исте животиње узоркован је тек након 6 или више сати од угинућа животиње.
- Узорци старији од 4 сата, а нису потопљени у транспортни медијум.
- Хемолизирана крв за серолошке реакције.
- Исушени узорци.
- Узорци у формалину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinane A., Maguire D. (2013) *Clinical Veterinary Microbiology*, Second Edition, Elsevier Ltd.
2. Isenberg H.D. (2004) *Clinical microbiology procedures handbook*, 2nd edition, ASM Press, USA.
3. McVey D.S., Kennedy M., Chengappa M.M. (2013) *Veterinary microbiology*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc
4. Willey J.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J. (2014) *Prescott's Microbiology*, ninth edition, The McGraw-Hill Companies Inc, USA
5. Švabić-Vlahović M. (2008) *Medicinska bakteriologija*, prvo izdanje, Savremena Administracija, Beograd.
6. Milić N., Krnjaić D., Mišić D., Nišavić J., Radojčić M. (2017) *Mikrobiologija sa imunologijom*, Naučna KMD, Beograd,
7. Russell P.H., Edington N. (1988) *Veterinary viruses*, 2nd edition, The Burlington Press, UK.
8. Quinn P.J., Markey B.K. (2003) *Concise review of veterinary microbiology*, Blackwell Publishing ltd, UK.
9. Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J.C, Leonard F.C., Maguire D. (2002) *Veterinary microbiology and microbial disease*, 1st edition, Blackwell Science, UK.
10. Ašanin R., Krnjaić D., Milić N. (2008) *Priručnik sa praktičnim vežbama iz mikrobiologije sa imunologijom*, drugo autorsko izdanje, Beograd.
11. Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G., (2006) *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins, USA.
12. Levinson W. (2008) *Rewiev of medical microbiology and immunology*, 10th edition, The McGraw-Hill Companies Inc, USA.