

Značenje direktne mikroskopije u mikrobiološkoj dijagnostici tuberkuloze

Farkaš, Ljubica

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:286442>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Ljubica Farkaš

**ZNAČENJE DIREKTNE
MIKROSKOPIJE U MIKROBIOLOŠKOJ
DIJAGNOSTICI TUBERKULOZE**

Diplomski rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Ljubica Farkaš

**ZNAČENJE DIREKTNE
MIKROSKOPIJE U MIKROBIOLOŠKOJ
DIJAGNOSTICI TUBERKULOZE**

Diplomski rad

Osijek, 2015.

RAD JE OSTVAREN U ODJELU ZA KLINIČKU
MIKROBIOLOGIJU OPĆE ŽUPANIJSKE BOLNICE POŽEGA

MENTOR: doc. dr. sc. prim. SUZANA BUKOVSKI SIMONOSKI,
dr. med. specijalist medicinske mikrobiologije

RAD IMA 33 LISTA, 7 TABLICA I 5 SLIKE

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc. dr. sc. Suzani Bukovski Simonoski, na iskustvu, znanju i stručnim savjetima tijekom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, Hrvoju, Lovri i Luciji na strpljenju i razumijevanju svih ovih godina.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Uzročnik tuberkuloze	1
1.1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
1.2. Epidemiologija tuberkuloze.....	2
1.3. Patogenost <i>M. tuberculosis</i>	3
1.4. Liječenje oboljelih od tuberkuloze	4
1.5. Mikrobiološka dijagnostika tuberkuloze	5
1.5.1. Obrada uzoraka za mikrobiološku dijagnostiku tuberkuloze i priprema razmaza za mikroskopsku pretragu	5
1.5.2. Kultivacija	7
1.5.3. Identifikacija poraslog soja.....	7
1.5.4. Test osjetljivosti na antituberkulotske lijekove	8
2. CILJEVI RADA	9
3. ISPITANICI I METODE	10
3.1. Ustroj studije.....	10
3.2. Ispitanici	10
3.3. Metode	10
3.3.1. Direktna mikroskopska pretraga.....	10
3.4. Statistička obrada.....	13
4. REZULTATI	14
4.1. Zbirni podatci	14
4.2. Rezultati direktne mikroskopske pretrage i kultivacije	16
5. RASPRAVA	20
6. ZAKLJUČAK	25
7. SAŽETAK	26
8. SUMMARY	28
9. LITERATURA	29
10. ŽIVOTOPIS	32
11. PRILOZI	33

POPIS KRATICA

TB - tuberkuloza

ARB - acidorezistentni bacili

MTB - *Mycobacterium tuberculosis*

NTM - netuberkulozne mikobakterije

MGIT - eng. *Mycobacteria growth indicator tube*

HIV - virus humane imunodeficijencije

ATL - antituberkulotski lijekovi

INH - izoniazid

R - rifampicin

PZA - pirazinamid

E - etambutol

S - streptomycin

NALC-NaOH - n-acetyl-L-cistein-NaOH

MDR-TB - eng. *multi-drug-resistant tuberculosis*

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

1. UVOD

Tuberkuloza ili sušica je zarazna bolest koju uzrokuje *Mycobacterium tuberculosis*. Jedna je od vodećih pojedinačnih uzroka smrti od zaraznih bolesti kroz povijest, a i danas. Iako prati ljudski rod od davnina, u 17. stoljeću počinje epidemijski val s visokim pobolom i smrtnosti. Godine 1882. Robert Koch je otkrio uzročnika tuberkuloze, *Mycobacterium tuberculosis*, a nakon toga i metodu bojanja čineći ga time vidljivim pod svjetlosnim mikroskopom. Taj događaj predstavlja rođenje dijagnostike tuberkuloze te je omogućio daljnja istraživanja koja su dovela do novih spoznaja i metoda na području dijagnostike i terapije tuberkuloze (1).

Tuberkuloza može zahvatiti bilo koji organ ljudskog tijela i mikrobiološki se mogu obraditi razni klinički uzorci. Pristup u borbi protiv tuberkuloze mora biti multidisciplinaran. Uz kliničare i epidemiologe, vrlo je važna i nezaobilazna uloga mikrobiološkog laboratorija. Brzo otkrivanje samog uzročnika dovodi do pravovremene reakcije svih stručnjaka uključenih u kontrolu bolesti. Rano postavljanje dijagnoze i uvođenje terapije omogućuje liječenje pojedinca i sprječavanje širenja infekcije u društvenoj zajednici.

1.1. Uzročnik tuberkuloze

Tuberkuloza (TB) je niz kliničkih i mikrobioloških reakcija koje nastaju kao upalni odgovor ljudskog organizma na infekciju patogenim bakterijama *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) i njihovih antigena. Mikobakterije su rod bakterija, među koje se ubrajaju mnoge vrste s različitim stupnjevima patogenosti za čovjeka.

Klasifikacija u nekoliko najbitnijih grupa prema patogenosti za čovjeka:

1. *Mycobacterium tuberculosis complex*, koji mogu uzrokovati tuberkulozu: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*;
2. *Mycobacterium leprae*, koji uzrokuje gubu, lepru ili Hansenovu bolest;
3. Netuberkulozne mikobakterije (NTM) koje uzrokuju plućnu infekciju nalik tuberkulozi: *Mycobacterium avium complex* (MAC), *M. kansasii*, *M. xenotip*, *M. abscessus* (19).

1.1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis je uzročnik tuberkuloze, bolesti ljudi, a čovjek mu je jedini prirodni domaćin. Bacili tuberkuloze nepokretni su, asporogeni, ravni ili lagano zavinuti štapići, veličine 0,2 - 0,6 x 1 - 10 µm. Mnoge osobine MTB-a posljedica su njegove stanične stjenke, bogate lipidima. Stanična stjenka mikobakterija je građena od četiri sloja. Prvi sloj peptidoglikan (murein) je kovalentno vezan na polisaharid arabinogalaktana na koji se veže mikolična kiselina sa 60 - 90 ugljikovih atoma i izrazito su hidrofobnih osobina. Četvrti sloj, površinski, čine peptidoglikolipidi, sulfolipidi, cord-faktori i voskovi na kojima se nalaze receptori za fage i seroaglutinaciju (19).

MTB je aerobna bakterija sporog rasta (generacijsko vrijeme 18 - 22 h) i zahtjevna za uzgoj. Za izolaciju se koristi kruta jajčana podloga po Löwenstein-Jensenu. Kolonije se pojavljuju nakon 3 - 12 tjedana inkubacije na 35 - 37°C. Kolonije su hrapave, uzdignute i naborane površine, krem boje te izgledaju poput cvjetače. Otporan je na sušenje, a osjetljiv na sunčane, odnosno UV zrake (4, 5). Pokazuje izrazitu acidoalkoholnu rezistentnost, sposobnost zadržavanja bazične boje karbol-fuksina i nakon ispiranja kiselim alkoholom koja je važna osobina u identifikaciji mikobakterija. Karbol-fuksin se veže za mikoličnu kiselinu, a peptidoglikan staničnog zida sprječava njihovo odbojavanje.

1.2. Epidemiologija tuberkuloze

Prema procjeni Svjetske zdravstvena organizacija (SZO) u 2012. godini oboljelo je 8,6 milijuna ljudi (incidencija 122/100 000 stanovnika), a 1,3 milijuna je umrlo od ove bolesti (2). U odnosu na svijet, s incidencijom od 12,5/100 000 u 2012. godini, Hrvatska je zemlja s niskom incidencijom tuberkuloze, iako je to zarazna bolest od koje umire najviše Hrvata, oko 43 osobe godišnje (3).

Geografska distribucija stopa incidencije u Hrvatskoj pokazuje veće stope u sjevernim i istočnim, nego u južnim dijelovima zemlje. Klimatske prilike tijekom zime olakšavaju širenje uzročnika te se viša incidencija u istočnim i sjevernim županijama smatra posljedicom kontinentalne klime s hladnim zimama i rjeđim boravcima na otvorenom. Jedan od razloga takve geografske distribucije je i migracija tijekom Domovinskog rata i nakon rata koje su

bile izraženije u županijama uz granicu s Bosnom i Hercegovinom, koja je imala najviše stope incidencija tuberkuloze u regiji (6).

Od tuberkuloze najviše oboljevaju najstarije dobne skupine. Smatra se da se u ovoj populaciji radi o infekciji koja je nastupila ranije u životu, ali sa slabljenjem obrambenih snaga organizma i uslijed nekih drugih bolesti dolazi do reaktivacije starog tuberkuloznog procesa. To je obilježje razvijenih zemalja svijeta. U zemljama s lošom epidemiološkom situacijom i s onima u razvoju, tuberkuloza prevladava u mlađim dobnim skupinama (7). Muškarci češće oboljevaju nego žene, pretpostavlja se zbog hormonskih čimbenika. Među oboljelima dominiraju oni s tuberkulozom pluća (90 %) (8). Problemi s kojima se u nadzoru nad tuberkulozom bore mnoge zemlje su visoka incidencija tuberkuloze u djece, rezistencije na antituberkulotske lijekove (ATL), tuberkuloze povezane s infekcijom virusom humane imunodeficijencije (HIV) te dostupnosti antituberkulotika. U Hrvatskoj se uspješno drže pod kontrolom, zahvaljujući nacionalnom programu koji provodi besplatnu prevenciju, dijagnostiku i liječenje tuberkuloze (9).

1.3. Patogenost *M. tuberculosis*

M. tuberculosis najuspješniji je bakterijski patogen na svijetu, a virulentni sojevi posjeduju brojne mehanizme kojima uzrokuju bolest. U većini slučajeva bolest se prenosi među ljudima preko respiratornog sustava, kihanjem, govorom, iskašljavanjem zaraženog bolesnika. Dovoljno je manje od 10 bacila da se inhalacijom deponiraju u periferne alveole donjih dijelova pluća i uzrokuju infekciju i upalu kod osobe. Oko 4 - 10 tjedana nakon infekcije razvija se stanično posredovana reakcije preosjetljivosti i tuberkulinska reakcija postaje pozitivna. Nastaje granulom s kazeoznom nekrozom u plućnom tkivu i pripadajućem limfnom čvoru tzv. Gohnovo žarište (10). Razvoj aktivne tuberkuloze nakon infekcije ovisi o baktericidnoj aktivnosti makrofaga, ali i količini i virulenciji MTB-a. Rizik inficiranja bakterijom MTB određen je uglavnom vanjskim čimbenicima poput stanja tuberkuloznog bolesnika, bliskosti i trajanju kontakta s bolesnikom. U prosjeku 90 - 95 % osoba neće razviti bolest i MTB će kod njih ostati u fazi latentne infekcije čitav život, pod nadzorom imunološke obrane. 5 - 10 % inficiranih osoba u jednom će trenutku oboljeti. Ta činjenica omogućuje da inficirane osobe imaju doživotni rizik za razvoj bolesti (8, 11).

Poznato je da su bacili tuberkuloze neophodni, ali ne i dovoljni da bi čovjek obolio od tuberkuloze. Različiti su čimbenici povezani s razvojem tuberkuloze. Od socioekonomskih čimbenika najčešće su uočeni siromaštvo, napušteni uvjeti življenja, nezaposlenost i beskućništvo. Alkoholizam, pušenje, intravenska uporaba droga, često su prisutni bihevioralni čimbenici, dok bolesti i stanja poput HIV-infekcije, presađivanja organa, šećerne bolesti, imunosupresivne terapije, malignih oboljenja te pothranjenosti čine važne biološke čimbenike (8, 12).

1.4. Liječenje oboljelih od tuberkuloze

Liječenje tuberkuloze je složen problem zbog više razloga. Prvo, *M. tuberculosis* ima kompleksan stanični zid koji otežava djelovanje antibiotika, zatim se uglavnom nalazi unutarstanično okružen nekrotičnom masom te se sporo dijeli pa je potrebno dugotrajno liječenje. Također, određeni broj bakterija je rezistentan na određene antibiotike te je potrebna kombinacija antibiotika u liječenju (4, 13).

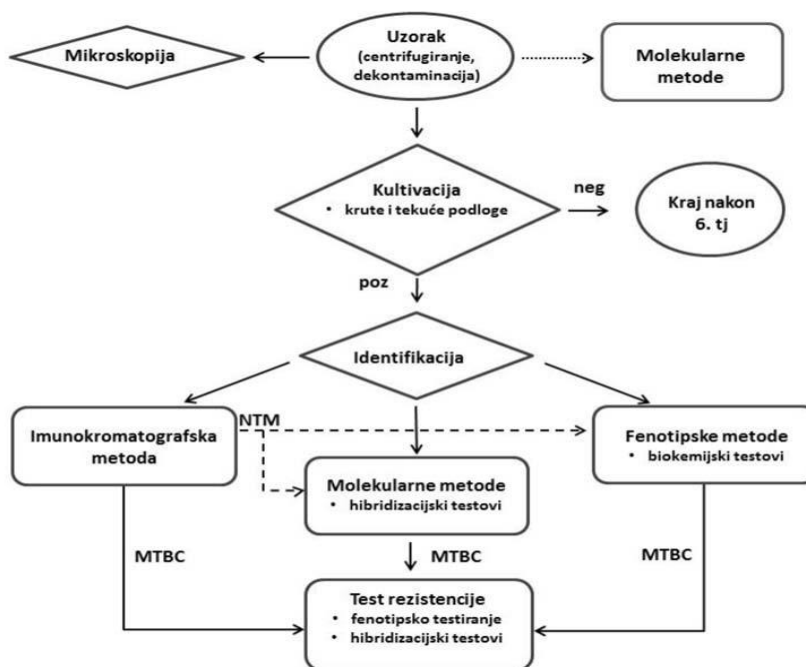
U prvi red antituberkulotika (ATL) ubrajaju se izoniazid (INH), rifampicin (R), pirazinamid (PZA), etambutol (E) i streptomycin (S). U drugu liniju antituberkulotika ubrajaju se rifabutin, kinoloni, paraaminosalicilna kiselina, cikloserin, etionamid, amikacin, kanamicin. Ukoliko soj stvori rezistenciju na izoniazid i rifampicin koji su temeljni i najučinkovitiji antituberkulotici, smatra se multirezistentnim (14).

Prevenција tuberkuloze odnosi se na BCG cijepljenje (suspencija živih bacila *M. bovis* tj. BCG-soj) i kemoprofilaksu. BCG cijepljenjem postiže se stanje primarne infekcije i svrhovito je samo ako se cijepu djeca u prvoj godini života i ne može se potpuno spriječiti pojava tuberkuloze, ali se može smanjiti pojava teških oblika poput diseminirane tuberkuloze i tuberkuloznog meningitisa. Kemoprofilaksa je zaštitna mjera koja se provodi izoniazidom kako bi se spriječio razvoj bolesti u već inficiranih osoba (4).

1.5. Mikrobiološka dijagnostika tuberkuloze

Mikrobiološka dijagnostika tuberkuloze temeljni je i obavezni dio svakog nacionalnog programa suzbijanja tuberkuloze. Bitna je u postavljanju dijagnoze, otkrivanju novooboljelih, odabiru odgovarajuće terapije i praćenju uspješnosti liječenja.

Metode konvencionalne mikrobiološke dijagnostike jesu direktna mikroskopska pretraga acidorezistentnih bacila u kliničkom uzorku, kultivacija na krutim i tekućim podlogama, identifikacija poraslog soja i test osjetljivosti. Nakon primitka uzorka radi se klasičan algoritam pretraga (Slika 1).



Slika 1. Shema dijagnostičkih pretraga na mikobakterije

1.5.1. Obrada uzoraka za mikrobiološku dijagnostiku tuberkuloze i priprema razmaza za mikroskopsku pretragu

Temelj uspješne mikrobiološke dijagnostike tuberkuloze je kvalitetan uzorak. Uz količinu i kvalitetu, transport uzorka u laboratorij, čuvanje te metode koje se koriste u laboratorijima najvažniji su čimbenici koji utječu na konačan ishod pretrage.

Najčešće pretraživani uzorak je iskašljaj koji se preporuča uzeti nakon toaleta usne šupljine, 3 do 5 ml dubokog iskašljaja u sterilnu posudicu s poklopcem. Nepravilan uzorak odnosno slina

daje lažno negativne rezultate unatoč mogućnosti da ispitanik ima bacile u sputumu. Jedan od najčešćih uzroka lažno negativnih nalaza je neadekvatan uzorak. Potrebno je prije obrade, makroskopski ili mikroskopski ocijeniti uzorak te u slučaju neadekvatno uzetog uzorka odnosno sline, odbaciti uzorak iz obrade. Prisutnost neutrofila u uzorku ukazuje na adekvatan uzorak, dok skvamozne epitelne stanice ukazuju na slinu (21). Moguće je makroskopski procijeniti uzorak jer je slina vodenastog izgleda, dok je sputum poput gnoja (22). Kod plućne tuberkuloze koja je najčešća potrebno je pregledati tri uzastopna uzorka prije početka terapije, zatim nakon dva mjeseca terapije te na kraju terapije. Kod pacijenata koji nisu u mogućnosti dati iskašljaj, potrebna je indukcija inhalacijom hipertonične otopine natrijeva klorida.

Druga po učestalosti je tuberkuloza mokraćnog sustava i preporuča se pregledati pet do deset uzoraka urina. Aspirat bronha, bronhoalveolarni aspirat, preporuča se cijeli uzorak sa što manje anesthetika jer može spriječiti rast bacila. Primarno sterilni uzorci preporučaju se uzeti u sterilnim uvjetima u što većim količinama te se prave direktni razmazi bez prethodne obrade i koncentracije bacila centrifugiranjem što ima za posljedicu vrlo mali broj bacila te teško postavljanje dijagnoze. Želučani lavat uzima se kod djece aspiracijom 50 ml želučanog sadržaja rano u jutro te se neutralizira s NaH_2PO_4 (9).

Uzorke je potrebno dobro upakirati te spriječiti izlivanje i kontaminaciju tijekom transporta. Uzorci moraju biti obilježeni, popraćeni uputnicom te dostavljeni u laboratorij u 24 sata. U suprotnom se uzorci čuvaju na $+4^\circ\text{C}$ (9).

Primarno sterilni uzorci se zasijavaju direktno na hranjive podloge bez obrade, dok uzorci poput iskašljaja, lavata želuca, brisa larinksa te urina sadržavaju popratne bakterije i gljive te prije zasijavanja na hranjive podloge potrebno ih je obraditi radi dekontaminacije i likvefakcije.

Za dekontaminaciju se koristi NALC-NaOH, kombinacija mukolitika n-acetyl-L-cisteina i NaOH je najučinkovitija. Uzorci se oslobađaju mikroorganizama normalne i prolazne flore koji se nalaze u stanicama i detritusu. Postupak dekontaminacije traje 20 minuta i preživljavaju ga samo alkoholo-acidorezistentne bakterije. Likvefakcijom, dodatkom 40 ml fosfatnog pufera i laganim miješanjem uzorka se pospješuje izlazak bacila iz stanice i prekida se proces neutralizacije. Sljedeći korak je koncentriranje bacila centrifugiranjem kojim se povećava mogućnost izolacije i malog broja bacila. Uzorak se centrifugira 20 min/3000 okretaja u minuti. Iako su postupci obrade blagi, obradu preživi oko 20 % ukupne populacije bacila iz uzorka (19). Kvaliteta procesa dekontaminacije prati se brojem kontaminiranih

kultura. 2 - 5 % kontaminiranih kultura ukazuje na pravilnu dekontaminaciju, manje od 2 % kontaminacija ukazuje na preagresivnu dekontaminaciju, dok više od 5 % kontaminacija govori o nedovoljnoj dekontaminaciji (15).

Supernatant se odbacuje, a iz sedimenta se pravi razmaz površine 1 - 2 cm jer veća površina smanjuje efikasnost mikroskopiranja. Preostali dio sedimenta se resuspendira s 1,5 ml fosfatnog pufera i zasijava prema protokolu kultivacije *M. tuberculosis* na najmanje jedno kruto hranilište (Löwenstein-Jensen ili Middlebrook) te u tekuće hranilište (MGIT – *mycobacteria growth indicator tube*, BD Diagnostics) (15).

1.5.2. Kultivacija

Samo se kultivacijom mogu otkriti mikroskopski negativne tuberkuloze te razlikovati *M. tuberculosis* od netuberkuloznih mikobakterija (NTM) i ispitati osjetljivost na antituberkulotike. Kultivacijom se može detektirati oko 10 i više bacila u 1 ml uzorka te je zlatni standard u dijagnostici mikobakterija.

Za kultivaciju *M. tuberculosis* na čvrstim podlogama najčešće se koristi Löwenstein-Jensen podloga koja sadrži jaja, glicerol, krumpirovo brašno za rast mikobakterija te malahnitno zelenilo kao inhibitor gram pozitivnih bakterija. Zasijane podloge se inkubiraju u aerobnim uvjetima na 35 - 37°C, šest tjedana te nakon toga se izdaje negativan nalaz. Ovisno o broju bacila u kliničkom uzorku, prosječno javljanje pozitivnih nalaza na krutim podlogama je 16 - 29 dana (19). Tekuće hranilište MGIT-a (*mycobacteria growth indicator tube*, BD Diagnostics) omogućuje bržu kultivaciju i osjetljivost koja je 10 % veća, nego na krutim podlogama. Epruveta MGIT-a s indikatorom rasta sadrži 4 ml modificirane baze Middlebrook 7H9 bujon (17).

1.5.3. Identifikacija poraslog soja

U poraslom je soju potrebno identificirati vrstu iz roda *Mycobacterium*. *M. tuberculosis* se razlikuje od drugih vrsta mikobakterija, mikroskopski pokazuju svojstva acidoalkoholne rezistentnosti pa su vidljivi crveni štapići kod bojanja po Ziehl-Neelsenu, a kod bojanja

auraminom žuto-narančasti fluorescentni štapići. Makroskopski, kolonije su svjetlo žute boje, suhe, hrapave, izdignutih i nepravilnih rubova te karakterističnog izgleda cvjetače na Löwenstein-Jensenn podlozi, rastu nakon inkubacije 3 - 6 tjedana na temperaturi 35 - 37°C (19).

Od biokemijskih testova koristi se niacinski test koji je za *M. tuberculosis* pozitivan te reakcija katalaze koja je također pozitivna. Biokemijski testovi su dugo vremena bili jedini način identifikacije vrste, a u novije vrijeme zamjenjuju ih molekularne metode. Sve se više koristi brza dijagnostika tuberkuloze koja se temelji na amplifikaciji nukleinskih kiselina MTB-a direktno iz kliničkog uzorka. Metode su osjetljive i visoko specifične za MTB, ali ne zamjenjuju mikroskopiju, kultivaciju i kliničku prosudbu. Od novih molekularnih metoda, test Xpert MTB/RIF od Cepheida, kojim se može detektirati MTB u dva sata s većom točnošću detekcije MTB-a za 45 % od mikroskopije te detektirati rezistenciju na rifampicin (RIF). Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) preporuča tu metodu kod HIV pozitivnih osoba i kod osoba s visokim rizikom za multirezistentnu tuberkulozu (MDR-TB) (20).

1.5.4. Test osjetljivosti na antituberkulotske lijekove

Posljednji korak u dijagnostici tuberkuloze je ispitivanje osjetljivosti na antituberkulotike. Najčešće korištena metoda za određivanje osjetljivosti na antituberkulotike (ATL) je proporcija po Canettiju na krutoj podlozi Löwenstein-Jensenn. Uspoređuje se porast MTB-a između podloge u koju je dodan ATL i podloge u kojoj nema ATL. Nakon 4 tjedna inkubacije broje se kolonije na kontrolama i na podlogama s određenim kritičnim koncentracijama antituberkulotika te se određuje njihova proporcija. Soj se smatra rezistentnim ako je proporcija rezistentnih bacila u ispitivanom soju jednaka ili iznad kritične proporcije od 1 % . Potrebno je mjesec dana za rast mikobakterija na krutim podlogama, što je nedostatak ove metode (18). Danas se koriste tekuće podloge u automatiziranim sistemima kao standard za ispitivanje osjetljivosti MTB, vrijeme potrebno za izvedbu testa je 2 tjedna. Ukoliko se otkrije rezistencija, potvrda se radi molekularnim testovima (19).

2. CILJEVI RADA

Ciljevi rada bili su:

1. Utvrditi udio direktno mikroskopski pozitivnih uzoraka na MTB obrađenih na Odjelu za kliničku mikrobiologiju Opće županijske bolnice Požega tijekom 2014. godine radi mikrobiološke obrade na tuberkulozu,
2. Utvrditi udio uzoraka kod kojih je detektirana pozitivna kultura na krutim i tekućim podlogama u ukupnom broju obrađenih uzoraka u promatranom razdoblju te u odnosu na udio direktno mikroskopski pozitivnih uzoraka,
3. Definirati mogućnosti metode direktne mikroskopije u procjeni kvalitete uzoraka prispjelih u laboratorij radi mikrobiološke obrade na tuberkulozu,
4. Procijeniti značaj metode direktne mikroskopije u mikrobiološkoj dijagnostici tuberkuloze.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj studije

Ovo retrospektivno istraživanje izrađeno je na Odjela za kliničku mikrobiologiju Opće županijske bolnice Požega tijekom svibnja i lipnja 2015. godine. Podatci o ispitanicima, materijalima i rezultatima testiranja dobiveni su iz baze podataka Odjela za kliničku mikrobiologiju OŽB Požega

3.2. Ispitanici

Istraživanjem su obuhvaćeni svi klinički uzorci ispitanika koji su analizirani na tuberkulozu u Odjelu za kliničku mikrobiologiju OŽB Požega od 1. siječnja 2014. godine do 31. prosinca 2014. godine. Ispitanici čiji su klinički uzorci uključeni u analizu u navedenom periodu, nisu aktivno sudjelovali u ovom istraživanju kao ispitanici te je tajnost njihovih podataka bila u potpunosti zaštićena.

3.3. Metode

3.3.1. Direktna mikroskopija

U rutinskom radu u Odjelu za kliničku mikrobiologiju OŽB Požega za bojanje razmaza kliničkih uzoraka za direktnu mikroskopiju zbog sposobnosti mikobakterija da zadržavaju primarnu boju nakon odbojavanja kiselim alkoholom koristi se acidorezistentno bojanje. Najstarija metoda acidorezistentnog bojanja je metoda po Z-N-u (Ziehlu-Neelsenu) koja je u novije vrijeme zamijenjena metodom bojanja fluorescentnom bojom auraminom O. Mikroskopiranje preparata iz uzoraka obojenih po Z-N-u (Ziehlu-Neelsenu) ili fluorescentnom bojom auraminom još su uvijek jedna od bržih metoda u dijagnostici tuberkuloze. U direktnoj mikroskopskoj pretrazi uzoraka koriste se tehnike detekcije

svjetlosnim (bojanje po Ziehl-Neelsenu) i fluorescentnim mikroskopom (bojanje auraminom). metode (15).

Postupak bojanja po Ziehl-Neelsenu

- Osušeni i fiksirani preparat prelići bojom karbol fuksin, lagano zagrijavati plamenikom do pojave pare,
- Nakon hlađenja postupak se ponavlja tri puta,
- Isprati vodom,
- Odbojavati 3 % kiselim alkoholom 2 minute,
- Isprati vodom,
- Preparat prelići bojom metilenskim plavilom ili brilijant zelenilom 2 minute,
- Isprati vodom i osušiti.

Postupak bojanja auraminom

- Osušeni i fiksirani preparat prelići otopinom auramina 25 minuta,
- Isprati vodom,
- Odbojavati 0,5 % zasićenim kiselim alkoholom 2 minute,
- Isprati vodom,
- Preliti kalij permanganatom 4 minute,
- Preliti metilenskim plavilom,
- Isprati vodom i sušiti na zraku.

U Odjelu za kliničku mikrobiologiju OŽB Požega se prema preporukama CDC-a, mikroskopiraju 3 horizontalne paralele i 9 okomitih linija preparata, ukupno 300 vidnih polja. Uzorak se proglašava negativnim nakon 15 minuta mikroskopiranja (15). Korištenje standardiziranih metoda omogućit će kod oboljelih osoba koje izlučuju više od 10 000 bacila u 1 ml iskašljaja da direktni mikroskopski preparat bude pozitivan (4, 5, 13).

Direktni preparati obojeni metodom po Ziehl-Neelsenu mikroskopiraju se svjetlosnim mikroskopom, imerzijskim objektivom 100 x za koje je potrebno imerzijsko ulje i ukupno povećanje slike je 1000 x. Pronalazak crvenih, lagano savijenih štapićastih bakterija na plavoj podlozi ukazuje na prisutnost mikobakterija u uzorku. Nalaz se izdaje kao negativan ako u razmazu nisu nađeni acidorezistentni bacili te je potrebno ponoviti uzorak ako su nađena 1 - 2 ARB-a u cijelom razmazu. Pronalaskom 1 - 9 ARB-a na 100 polja, rezultat je pozitivan 1+, pronalaskom 1 - 9 ARB-a na 50 polja, rezultat je pozitivan 2+, a pronalaskom 1 - 9 ARB-a u jednom polju, pozitivan je 3+ te ako ima više od 9 ARB-a u jednom polju, izdaje se kao pozitivan 4+ (15) (Tablica 1).

Direktni preparati obojeni bojom auramin O mikroskopiraju se fluorescentnim mikroskopom, 25 x ili 40 x objektivom i ukupno povećanje slike je 250 x ili 450 x. Auramin O je fluorokromna boja koja fluorescira žuto-narančasto. Pronalazak fluorescirajuće žuto-narančastih štapića na crnoj pozadini ukazuje na prisutnost mikobakterija u uzorku. Rezultat je negativan ako nisu nađeni ARB-ovi u razmazu te se ponavlja ako su pronađena 1 - 2 ARB-a u cijelom razmazu. 1 - 2 ARB-a na 50 polja interpretiraju se kao pozitivan 1+, 2 - 18 ARB-a 2+, 4 - 36 ARB-a u jednom polju 3+ i više od 36 ARB u jednom polju 4+ (15) (Tablica 1).

Tablica 1. Interpretacija acidorezistentnih razmaza

Ziehl-Neelsen	Auramin	Interpretacija
0	0	negativan uzorak
1 - 2/300 polja	1 - 2/70 polja	ponoviti uzorak
1 - 9/100 polja	1 - 2/50 polja	1+
1 - 9/50 polja	2 - 18/50 polja	2+
1 - 9/polju	4 - 36/polju	3+
> 9/polju	> 36/polju	4+

3.4. Statistička obrada

Svi prikupljeni kategorički podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Rezultati su prezentirani grafički ili tablično. Za usporedbu kategoričkih podataka u skupinama i između njih korišten je Hi-kvadrat test, a po potrebi Fisherov egzaktni test. Statistička analiza učinjena je programskim sustavom MedCalc (inčica 14.12.0, MedCalc Software), uz odabranu razinu značajnosti od $\alpha = 0,05$.

4. REZULTATI

Istraživanje je provedeno u jednogodišnjem razdoblju, od 1. siječnja do 31. prosinca 2014. godine, u Odjelu za kliničku mikrobiologiju OŽB Požega. Analizirani su svi uzorci obrađeni na mikrobiološku dijagnostiku tuberkuloze.

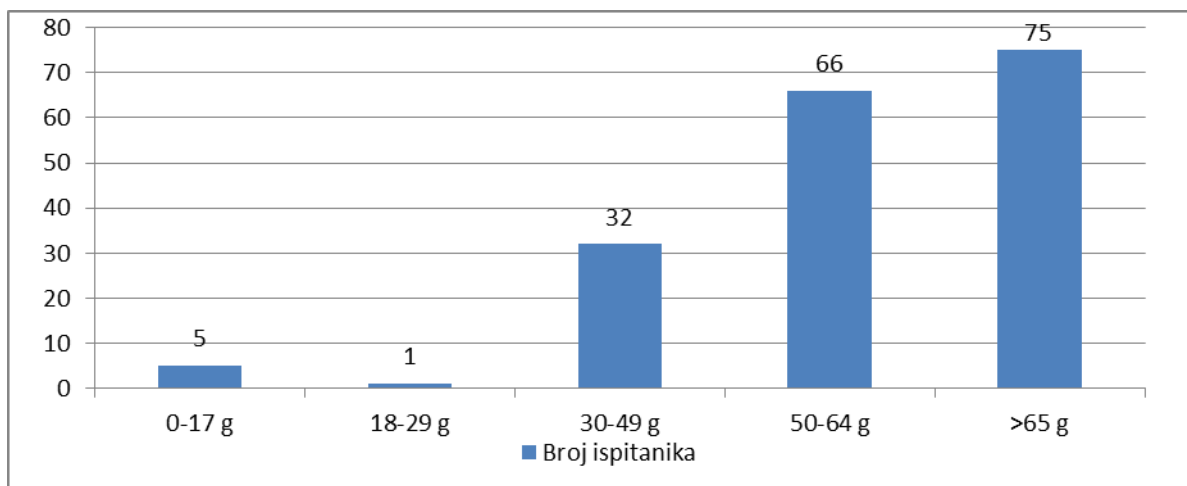
4.1. Zbirni podatci

U istraživanje je bilo uključeno 179 ispitanika koji su bili upućeni na bakteriološku dijagnostiku tuberkuloze, njih 97 (54,2 %) bili su muškog spola, a 82 (45,8 %) ženskog spola. Podjednako je bilo pripadnika oba spola (Fisherov egzaktni test; $p > 0,460$) (Tablica 2).

Tablica 2. Raspodjela ispitanika prema spolu

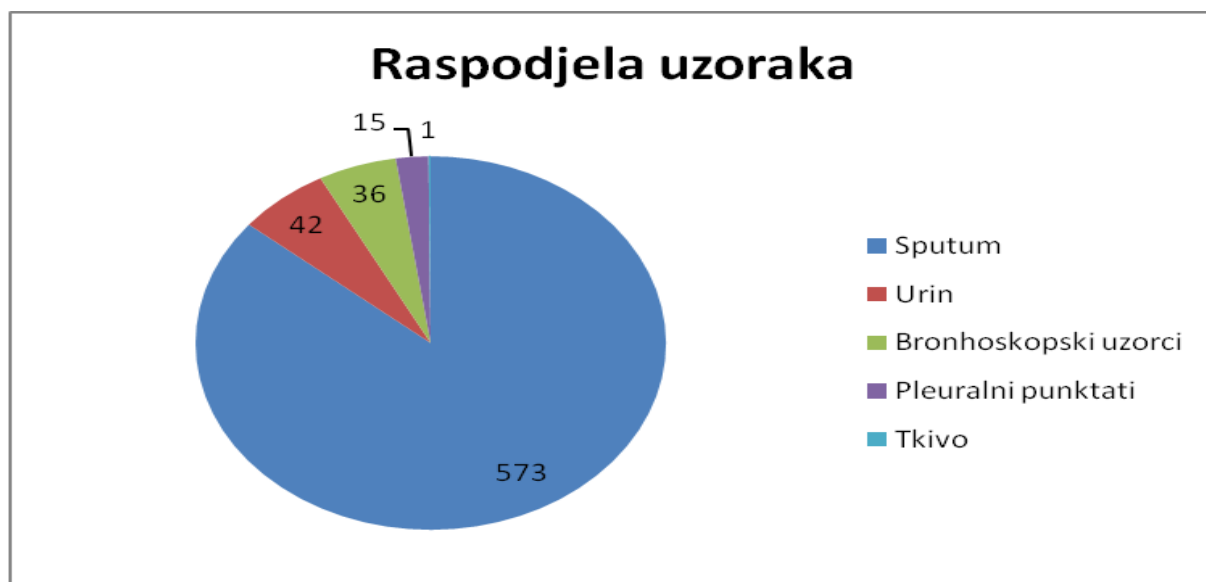
	Ukupan broj	Žene	Muškarci	P*
Ukupan broj ispitanika	179	82 (45,8 %)	97(54,2 %)	0,460

Ispitanici su bili raznih dobnih skupina. Pet (2,8 %) osoba je bilo mlađe od 17 godina, jedan (0,6 %) ispitanik bio je u skupini 18 - 29 g., 32 (17,9 %) ispitanika u skupini 30 - 49 g., 66 (36,9 %) ispitanika u skupini 50 - 64 g. te najviše ispitanika, njih 75 (41,9 %) bilo je starije od 65 g (Slika 2).



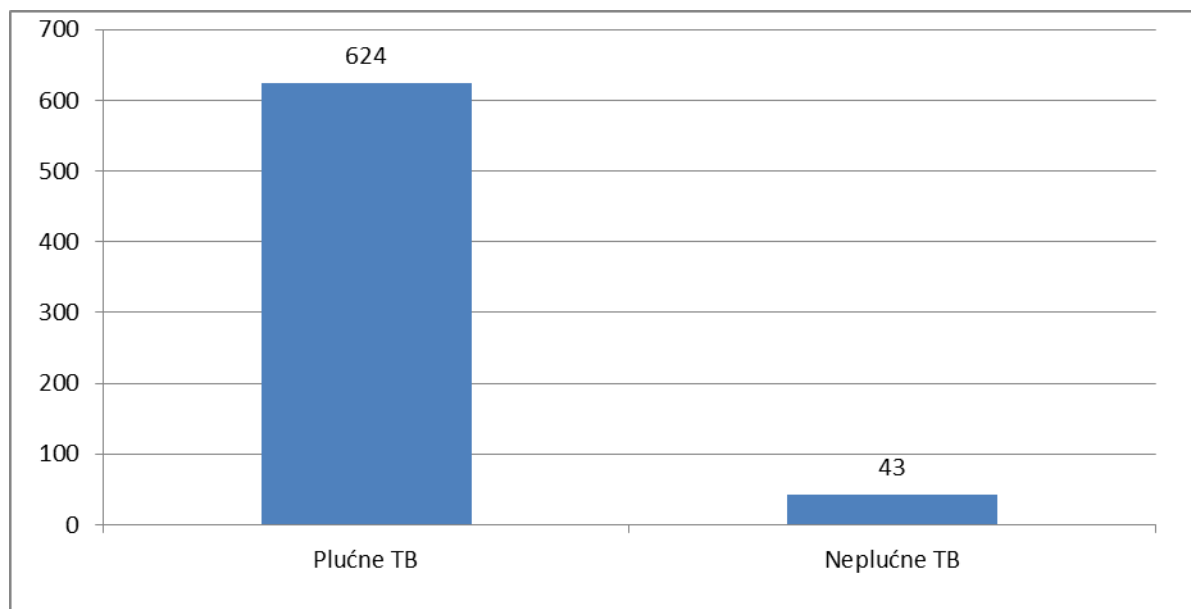
Slika 2. Dobna raspodjela ispitanika

Obrađeno je i analizirano 667 različitih kliničkih uzoraka upućenih na bakteriološku dijagnostiku tuberkuloze. Najveći je broj bio sputuma, koji je iznosio 573 (85,9 %); bronhoskopskih uzoraka bilo je 36 (5,39 %); obrađeno je i 15 pleuralnih punktata (2,25%); 1 uzorak tkiva (0,15%) i 42 uzorka urina (6,3%) (Slika 3).



Slika 3. Raspodjela prema vrsti kliničkih uzorak za bakteriološku dijagnostiku tuberkuloze

Nađena je značajna razlika između broja kliničkih uzoraka s obzirom na uputnu dijagnozu. Uputna dijagnoza plućne tuberkuloze je značajno češća u odnosu na dijagnozu neplućne tuberkuloze (Fisherov egzaktni test; $p < 0,001$) (Slika 4). Upućeno je čak 624 (93,6 %) uzoraka za dokazivanje plućne tuberkuloze, te 43 (6,4 %) za dokazivanje neplućne tuberkuloze.



* Fisherov egzaktni test; $p < 0,001$

Slika 4. Raspodjela uzoraka za dokazivanje plućnih i neplućnih tuberkuloza

4.2. Rezultati direktne mikroskopske pretrage i kultivacije

Istraživanje je pokazalo kako nije postojala statistički značajna razlika između dokazivanja MTB direktnom mikroskopskom pretragom i kultivacijom (Fisherov egzaktni test; $p > 0,647$) (Tablici 3). MTB je mikroskopskom pretragom dokazan u 46 (7,36 %) uzoraka, a kultivacijom u 42 (6,3 %) uzorka.

Tablica 3. Rezultati bakteriološke dijagnostike tuberkuloze direktnom mikroskopskom pretragom i kultivacijom

Godina	Ukupno uzoraka	Mikroskopska pretraga			Kultivacija			P*
		N	Pozitivna		N	Pozitivna		
			N	%		N	%	
2014.	667	625	46	7,36	667	42	6,3	> 0,647

*Fisherov egzakti test

Nije postojala statistički značajna razlika u dokazivanju uzročnika mikroskopskom pretragom sputuma ili drugih kliničkih uzoraka kao ni među dokazivanjem MTB kultivacijom sputuma ili drugih kliničkih uzoraka (Fisherov egzakti test; $p < 0,950$) (Tablica 4). Od 46 (7,36 %) mikroskopski pozitivnih kliničkih uzoraka u promatranom razdoblju, bilo je 45 (7,9 %) uzoraka sputuma te 1 (2,8 %) bronhoskopski uzorak. Pozitivnih kultivacija bilo je 42 (6,3 %), od čega 41 (6,15 %) sputum te 1 (2,8 %) bronhoskopski uzorak.

Tablica 4. Rezultati direktne mikroskopske pretrage i kultivacije prema kliničkim uzorcima

Vrsta uzorka	Ukupno uzoraka	Broj mikrosko-piranih uzoraka	Pozitivna mikroskopija		Pozitivna kultivacija		P*
			Broj	%	Broj	%	
Sputum	573	573	45(48,9)	7,90	41(48,7)	7,1	<0,950
Urin	42	0	0(0,0)	0	0(0,0)	0	
Bronhoskopski uzorci	36	36	1(1,1)	2,80	1(1,3)	2,80	
Pleuralni punktati	15	15	0(0,0)	0	0(0,0)	0	
Tkivo	1	1	0(0,0)	0	0(0,0)	0	

*Fisherov egzakti test

Nije nađena značajna razlika u rezultatima bakteriološke dijagnostike tuberkuloze s obzirom na spol ispitanika (Fisherov egzaktni test; $p = 0,786$). Pri usporedbi rezultata u bakteriološkoj dijagnostici i muški i ženski ispitanici podjednako su raspodijeljeni po svim kategorijama (Tablica 5). Od 14 pozitivnih ispitanika njih 6 (42,9 %) bile su žene, a nešto više njih 8 (57,1 %) su bili muškarci.

Tablica 5. Rezultati bakteriološke dijagnostike tuberkuloze i spolna raspodjela ispitanika

	Ukupan broj	Žene	Muškarci	P*
Ukupan broj ispitanika	179	82 (45,8 %)	97 (54,2 %)	0,786
Negativni ispitanici	165	76 (46 %)	89 (54 %)	
Pozitivni ispitanici	14	6 (42,9 %)	8 (57,1 %)	
Pozitivna mikroskopija	13	6 (46,2 %)	7 (53,8 %)	
Pozitivna kultivacija	11	5 (62,5 %)	6 (37,5 %)	

*Fisherov egzaktni test

Istraživanje je pokazalo da je MTB dokazan češće u uzorcima muškarac nego žene, no nije statistički značajno, a prosječna dob ispitanika s pozitivnim nalazom bila je $62,3 \pm 9,3$ godine (Tablica 6).

Tablica 6. Prosječna dob ispitanika s MTB prema njihovom spolu

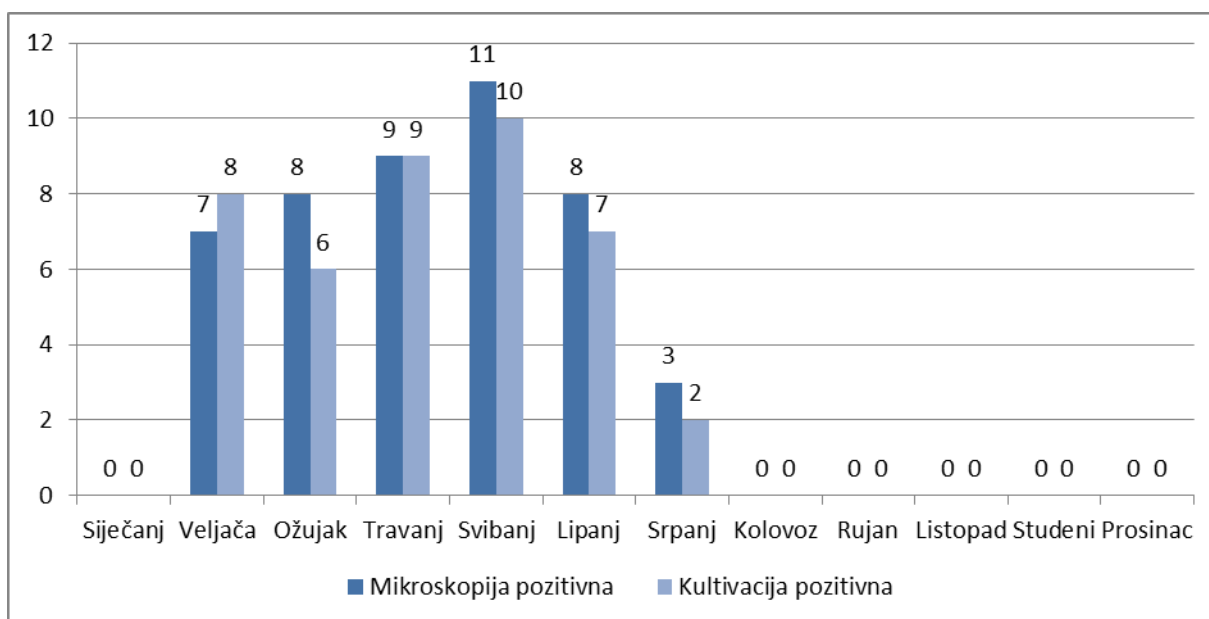
Spol	N	Min	Max	\bar{x}	SD
Muško	8	46,0	65,0	55,4	6,2
Žensko	6	57,0	87,0	69,3	12,4
Ukupno	14	46,0	87,0	62,3	9,3

Svi pozitivni uzorci javljaju se u razdoblju od veljače do srpnja, njih 46. Istraživanje je pokazalo kako nije bilo statistički značajne razlike po mjesecima (Fisherov egzaktni test; $p=0,885$). Međutim dobivena je značajna razlika prema mjesecima vezano uz broj zaprimljenih uzoraka, najviše uzoraka bilo je zaprimljeno u studenome, a najmanje u srpnju (Hi-kvadrat test; $p<0,001$) (Tablica 7). Usporedbom negativnih uzoraka po mjesecima također je dobivena značajna razlika ($p<0,001$; Hi-kvadrat test), najviše ih je također u studenome, a najmanje u travnju (Tablica 6).

Tablica 7. Distribucija zaprimljenih uzoraka za obradu u mikrobiološkom laboratoriju po mjesecima iz 2014. godine u Odjelu za kliničku mikrobiologiju OŽB Požega

	Siječanj	Veljača	Ožujak	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Ukupan broj
Broj uzoraka	72	83	57	34	45	47	35	39	47	44	108	56	667
Broj negativnih uzoraka	72	76	49	25	34	39	32	39	47	44	108	56	653
Mikroskopija pozitivna	00	7	8	9	11	8	3	00	00	00	00	00	46
Kultivacija pozitivna	00	8	6	9	10	7	2	00	00	00	00	00	42

Nađena je statistički značajna razlika između učestalosti pozitivnih uzoraka mikroskopskom pretragom te pozitivnih uzoraka kultivacijom ovisno o sezoni, raspodijeljenih po mjesecima. Pozitivna je mikroskopija najzastupljenija u svibnju (Fisherov egzakti test; $p < 0,001$), dok je pozitivna kultivacija najviše izrazito zastupljena od ožujka do lipnja (Fisherov egzakti test; $p = 0,004$) kao što je prikazano na Slici 5.



Slika 5. Učestalost pozitivnih mikroskopskih i pozitivnih kultura

5. RASPRAVA

Tuberkuloza je zarazna bolest, jedna je od vodećih pojedinačnih uzroka smrti od zaraznih bolesti. Rano postavljanje dijagnoze i uvođenje terapije omogućuje liječenje pojedinca i sprječavanje širenja infekcije u društvenoj zajednici. Direktna mikroskopska pretraga kao najbrža konvencionalna metoda od velikog je epidemiološkog i dijagnostičkog značaja.

U istraživanju su obrađeni podaci dobiveni mikrobiološkom dijagnostikom kliničkih uzoraka na tuberkulozu u Odjelu za kliničku mikrobiologiju Opće županijske bolnice Požega od 1. siječnja do 31. prosinca 2014. godine.

Od ukupno 179 ispitanika koji su upućeni na bakteriološku dijagnostiku tuberkuloze u 2014. g. u Odjel za kliničku mikrobiologiju OŽB Požega, njih 54,2 % (97/179) bili su muškog spola, a 45,8 % (82/179) bilo je ženskog spola. Podjednako je bilo pripadnika obaju spolova. Ispitanici su bili raznih dobnih skupina, a najbrojnija je skupina starijih od 65 godina.

U promatranom razdoblju obrađeno je i analizirano 667 različitih kliničkih uzoraka upućenih na bakteriološku dijagnostiku tuberkuloze. Najveći je broj bio sputuma, koji je iznosio 573 (85,9 %); bronhoskopskih uzoraka bilo je 36 (5,39 %); obrađeno je i 15 pleuralnih punktata (2,25%); 1 uzorak tkiva (0,15%) i 42 uzorka urina (6,3%).

Uputna dijagnoza plućne tuberkuloze je značajno češća u odnosu na dijagnozu neplućne tuberkuloze. Upućeno je čak 624 (93,6 %) uzoraka za dokazivanje plućne tuberkuloze, te 43 (6,4 %) za dokazivanje neplućne tuberkuloze.

Prema rezultatima mikrobioloških metoda za detekciju *M. tuberculosis* u kliničkim uzorcima direktne mikroskopske pretrage i kultivacije, istraživanje je pokazalo kako nije postojala statistički značajna razlika među pozitivnim mikroskopskim pretragama i pozitivnim kultivacijama. MTB je mikroskopskom pretragom dokazan u 46 (7,36 %) uzoraka, a kultivacijom u 42 (6,3 %) uzorka. Klinički uzorci urina se ne mikroskopiraju, tako da je stvarni udio mikroskopski pozitivnih uzoraka 7,36 % (46/625).

Nije postojala statistički značajna razlika u dokazivanju uzročnika mikroskopskom pretragom sputuma ili drugih kliničkih uzoraka kao ni među dokazivanjem MTB kultivacijom sputuma ili drugih kliničkih uzoraka. Od 46 (7,36 %) mikroskopski pozitivnih kliničkih uzoraka u

promatranom razdoblju, bilo je 45 (7,9 %) uzoraka sputuma te 1 (2,8 %) bronhoskopski uzorak. Pozitivnih kultivacija bilo je 42 (6,3 %), od čega 41 (6,15 %) sputum te 1 (2,8 %) bronhoskopski uzorak

Istraživanje je pokazalo kako je bilo 7,8 % (14/179) pozitivnih ispitanika, 42,8 % (6/14) žena i 57,2 % (8/14) muškaraca. Muškarci češće obolijevaju od žena, ali to nije statistički značajno te je prosječna dob pozitivnih ispitanika $62,3 \pm 9,3$ godine.

Direktna mikroskopska pretraga bila je pozitivna kod 7,36 % (13/179) ispitanika, kod 46,2 % žena i nešto više 53,8 % muškaraca. Kod 6,1 % (11/179) ispitanika kultivacija je bila pozitivna, kod 45,5 % žena i 54,5 % muškarca. Kod 72,7 % (8/11) ispitanika, 62 % žena i 38 % muškaraca porastao je *M. tuberculosis* u kulturi, a netuberkulozne mikobakterije porasle su u kulturi kod 27,3 % (3/11) ispitanika koji su bili muškog spola. Pri usporedbi rezultata u bakteriološkoj dijagnostici i muški i ženski ispitanici podjednako su raspodijeljeni po svim kategorijama.

Uspoređujući rezultate istraživanja s rezultatima Nacionalnog referentnog laboratorija za mikrobiološku dijagnostiku tuberkuloze u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, u Hrvatskoj je u 2013. godini bilo 4,1 % pozitivnih mikroskopija i 4,4 % pozitivnih kultivacija što je niže u odnosu na rezultate dobivene u ovom istraživanju, no nije nađena statistički značajna razlika među brojem mikroskopski pozitivnih uzoraka i među brojem kultivacijom pozitivnih uzoraka u ovim mjerenjima (24).

Gledajući ostale centre za dijagnostiku tuberkuloze u Hrvatskoj, u Bolnici za plućne bolesti i TBC Klenovnik bilo je najviše pozitivnih mikroskopija, čak 16,1 % te 15,4 % pozitivnih kultivacija što je za očekivati, zbog ciljane populacije koja se liječi od tuberkuloze u toj bolnici. Slijedi Rijeka s 2,8 % pozitivnih mikroskopija i 4,3 % pozitivnih kultivacija, Osijek 1,6 % pozitivnih mikroskopija i 2,7 % pozitivnih kultivacija, a najnižu stopu prevalencije ima Split s 1,2 % pozitivnih mikroskopija i 0,6 % pozitivnih kultivacija. Prema rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, može se zaključiti da je prevalencija tuberkuloze u Požeško-slavonskoj županiji pri vrhu u Hrvatskoj (24).

Promatrajući učestalost pozitivnih uzoraka po mjesecima u ovom istraživanju, primjetno je da se pozitivni uzorci javljaju u proljetnim i ljetnim mjesecima, od veljače do srpnja. U tom razdoblju nalaze se svi pozitivni uzorci u toj godini, njih 46. Broj pozitivnih uzoraka je jednak po mjesecima. Usporedbom broja obrađenih uzoraka po mjesecima dobivena je značajna

razlika prema mjesecima, najviše uzoraka bilo je u studenome, a najmanje u srpnju. Usporedbom negativnih uzoraka po mjesecima također je dobivena značajna razlika, najviše ih je također u studenome, a najmanje u travnju. NMT je također raspoređen podjednako po mjesecima. Analizirajući učestalost pozitivnih mikroskopija te pozitivnih kultura raspodijeljenih po mjesecima, nađena je statistički značajna razlika. Pozitivna mikroskopija je najzastupljenija u svibnju, dok je pozitivna kultivacija izrazito zastupljena od ožujka do lipnja.

Promatrajući rezultate dobivene u Odjelu za kliničku mikrobiologiju OŽB Požega od 2010. godine, kada je bilo 2,3 % pozitivnih mikroskopskih pretraga i 1,8 % pozitivnih kultivacija te 2013. godine kada je bilo 9,9 % pozitivnih mikroskopskih pretraga, a 7,9 % pozitivnih kultivacija, bilježi se uzlazni trend. Međutim, kada usporedimo rezultate iz 2013. godine s rezultatima iz 2014. godine s 7,36 % pozitivnih mikroskopskih pretraga i 6,3 % pozitivnih kultura, bilježi se blagi silazni trend. Pokazalo se da je statistički značajno odskakanje broja uzoraka u 2010. godini, no nema značajne razlike među brojem pozitivnih bakterioloških nalaza učinjenih mikroskopskim pretragama naspram pozitivnih bakterioloških nalaza dobivenih kultivacijom.

U većini laboratorija postotak pozitivnih direktnih mikroskopskih pretraga niži je u odnosu na postotak pozitivnih kultivacija što u ovom istraživanju nije slučaj. U dosadašnjim istraživanjima dokazana je specifičnost direktne mikroskopske pretrage 99 %, a osjetljivost je 25 - 75 % u odnosu na metodu kultivacije koja je zlatni standard u mikrobiološkoj dijagnostici tuberkuloze.

Lažno pozitivni rezultati direktne mikroskopske pretrage zbog kojih se pacijenti nepotrebno liječe uzrokovani su upotrebom stakalaca s ogrebotinama u kojima naslage boje izgledaju kao ARB, prekomjerno zagrijavanje karbol fuksina koje osuši preparat i kristalizira boju koja nalikuje na ARB te neodgovarajuće odbojavanje preparata alkoholom koje omogućuje saprofitima zadržavanje boje (15). Kod nekih pacijenata koji primaju antituberkulotsku terapiju, moguće je imati pozitivan direktni razmaz i negativnu kultivaciju jer sadržavaju nežive bacile u respiratornom traktu koji ne mogu porasti u kulturu. Također parcijalno acidorezistentne bakterije mogu dati pozitivan rezultat mikroskopskog preparata jer zadržavaju primarnu boju nakon odbojavanja slabim alkoholom te dokazano umanjuju specifičnost direktne mikroskopske pretrage.

Lažno negativni rezultati direktne mikroskopske pretrage imaju za posljedicu neliječenje oboljelog pacijenta te širenje bolesti. Najčešći uzroci su obrada neadekvatnog uzorka odnosno sline i pripreme debelih razmaza koji se oljušte pri ispiranju destiliranom vodom te prekovremeno korištenje kontrastnih boja koje mogu prikriti acidorezistentne bacile te ugasiti fluorescenciju bacila u razmazu (15). Nedostatak direktne mikroskopske pretrage je također nedovoljna osjetljivost jer je za pozitivnu mikroskopiju potrebna prisutnost više od 10^4 bacila u 1 mL uzorka što ide u prilog većeg postotka pozitivnih kultivacija koje za porast trebaju vrlo mali broj bacila, dokazano je da 10 i više bacila u uzorku daju pozitivnu kultivaciju.

U ovom istraživanju broj pozitivnih direktnih mikroskopskih pretraga je veći u odnosu na broj pozitivnih kultivacija ali nije statistički značajan, što u većini laboratorija nije slučaj. Može se pretpostaviti da su posljedica niske osjetljivosti i specifičnosti direktne mikroskopske pretrage. Jedan od uzroka slabe osjetljivosti su rezultati koji su dobiveni obradom neadekvatnih uzorka kao što je slina. Direktnim mikroskopiranjem i uvidom u broj epitelnih stanica i neutrofila moguće je procijeniti kvalitetu uzorka te eliminirati neadekvatne uzorke. Međutim, u Odjelu za kliničku mikrobiologiju OŽB Požega obrađuju se svi uzorci upućeni na bakteriološku dijagnostiku tuberkuloze bez prethodne makroskopske ili mikroskopske procjene adekvatnosti uzorka. Istraživanja o utjecaju kvalitetnog uzorka na rezultate direktne mikroskopske pretrage pretpostavljaju da procjena adekvatnosti uzoraka prije obrade utječe na poboljšanje rezultata direktne mikroskopske pretrage, međutim, potrebna su još dodatna istraživanja kako bi se metode standardizirale.

Khan i suradnici su 2009. godine istraživali u Pakistanu, u Federalnom Tb centru, utjecaj kvalitete uzorka na rezultate direktne mikroskopske pretrage. Istraživali su kvalitetu uzoraka na temelju makroskopske i mikroskopske procjene. Iskusni tehničari su vizualno odbacivali slinu, uzorke vodenastog izgleda, a gnojne uzorke su procijenili kao adekvatne. Mikroskopska procjena se temeljila na broju prisutnih neutrofila i skvamoznih epitelnih stanica (SEC) u razmazu uzorka obojenom po Z-N-u. Bilo je pet kriterija za mikroskopsku procjenu adekvatnog uzorka: više od jednog neutrofila u vidnom polju, više od 25 neutrofila u vidnom polju, manje od 25 SEC u vidnom polju, manje od 10 SEC te više neutrofila od skvamoznih epitelnih stanica u vidnom polju. Vizualnom je procjenom 16 % uzoraka proglašeno neadekvatno i nakon direktne mikroskopije u 0,2 % uzoraka nađeni su ARB-ovi. Kriterij koji je podrazumijevao više od jednog neutrofila u uzorku kao adekvatan, odbacio je 13 % uzoraka od kojih je 3 % bilo pozitivno nakon direktne mikroskopije. Ostali su kriteriji dali poražavajuće rezultate što opravdava tvrdnju da se SEC-ovi nalaze u gornjem dišnom

sustavu i ukazuju na kontaminaciju uzorka sadržajem iz usne šupljine. Istraživanje je dokazalo prednost vizualne u odnosu na mikroskopsku procjenu, kako zbog dobivenih rezultata tako i zbog vremena potrebnoga za mikroskopiju. Međutim, istraživanjem se nije uspjelo dokazati značajan utjecaj tih tehnika na povećanje osjetljivosti tehnike direktne mikroskopije, koja ima nisku osjetljivost kao nedostatak (22).

U Republici Kongo, u Mindouli, 2008. godine provedeno je istraživanje tehnike izbjeljivanja sedimenta te citološke analize uzorka u odnosu na direktnu dijagnostiku u dijagnostici tuberkuloze. Dio obrađenog uzorka uzeli su za direktnu mikroskopsku pretragu, a dio sedimenta su izbjeljivali 2,6 % klorom preko noći te preparat bojali po Z-N-u. Prihvatljivost uzorka procjenjivali su mikroskopski, kriterij je bio više od 10 neutrofila u vidnom polju za adekvatan uzorak. Dokazali su da je kombinacija tih dviju tehnika dala značajni porast pozitivnih preparata za čak 10,6 % u odnosu na rezultate dobivene direktnom mikroskopskom pretragom. Međutim, potrebna su još dodatna istraživanja kako bi se ta metoda implementirala u standardnu obradu uzoraka za dijagnostiku tuberkuloze (23).

6. ZAKLJUČAK

Temeljem ovog istraživanja može se zaključiti:

1. U Požeško slavonskoj županiji u 2014. godini, od ukupno 179 ispitanika koji su upućeni na bakteriološku dijagnostiku tuberkuloze, bilo je 7,8 % (14/179) pozitivno na MTB.
2. Direktna mikroskopska pretraga bila je pozitivna u 7,36 % (46/625) kliničkih uzoraka što je više u odnosu na broj pozitivnih kultivacija kojih je bilo 6,3 % (42/667).
3. Direktnom mikroskopskom pretragom moguće je procijeniti kvalitetu uzoraka na temelju neutrofila što povećava specifičnost i osjetljivost metode.
4. Iako je direktna mikroskopska pretraga znatno brža u odnosu na metodu kultivacije, zbog poznate niske osjetljivosti i specifičnosti mora je slijediti kultivacija, ali posebice stoga što se samo kultivacijom mogu razlikovati mikroskopski pozitivni uzorci *M. tuberculosis* od NTM-a. Također tako se mogu detektirati mikroskopski negativni bolesnici i stoga je zlatni standard u mikrobiološkoj dijagnostici tuberkuloze i nadalje kultivacija. Direktna mikroskopska pretraga može dobro poslužiti za preliminarnu dijagnostiku te je pomoć, a ne zamjena metodi kultivacije.

7. SAŽETAK

Pozadina istraživanja: Jedan od najvećih globalnih zdravstvenih problema današnjice jest tuberkuloza koju uzrokuje *Mycobacterium tuberculosis*. Pretpostavlja se da je danas uzročnikom tuberkuloze zaražen svaki treći čovjeku u svijetu, a svaka neliječena osoba oboljela od tuberkuloze zarazi 10 - 15 ljudi u svojoj okolini. Direktna mikroskopija kao najbrža tehnika u mikrobiološkoj dijagnostici tuberkuloze je od velikog značaja u dijagnostici, liječenju i sprječavanju širenja tuberkuloze.

Ciljevi istraživanja: Utvrditi broj pozitivnih mikroskopija u odnosu na pozitivne kultivacije te utvrditi značaj direktne mikroskopije u mikrobiološkoj dijagnostici tuberkuloze i u procjeni kvalitete uzorka.

Nacrt studije: Retrospektivno istraživanje

Ispitanci i metode: U ovom retrospektivnom istraživanju korišteni su podatci iz arhive Odjela za kliničku mikrobiologiju Opće županijske bolnice Požega od 1. siječnja do 31. prosinca 2014. godine. U istraživanje je bilo uključeno 179 ispitanika koji su upućeni na bakteriološku dijagnostiku tuberkuloze te je analizirano 667 kliničkih uzoraka. Za potvrđivanje prisutnosti infekcija tuberkuloze korištene su konvencionalne metode direktne mikroskopske pretrage i kultivacije.

Rezultati: Učestalost infekcije tuberkuloze na području Požeško-slavonske županije iznosila je 7,8 %. Utvrđeno je 7,36 % pozitivnih direktnih mikroskopija te nešto manje, 6,3 % pozitivnih kultivacija u 667 obrađenih kliničkih uzoraka. Istraživanje je pokazalo kako je infekcija češća kod muškaraca nego kod žena.

Zaključak: Utvrđeni udio pozitivnih direktnih mikroskopija u istraživanom području je među višima u Republici Hrvatskoj. Dokazan je veći udio pozitivnih mikroskopskih pretraga u odnosu na pozitivne kultivacije što nije slučaj u ostalim centrima za mikrobiološku dijagnostiku tuberkuloze. Provedenim istraživanjem može se zaključiti da je metoda direktne mikroskopske pretrage može dobro poslužiti za preliminarnu dijagnostiku te je pomoć, a ne zamjena metodi kultivacije koja je trenutno i zaslužen zlatni standard u mikrobiološkoj dijagnostici TB-a.

Ključne riječi: *Mycobacterium tuberculosis*; dijagnostika tuberkuloza; direktna mikroskopija; kultivacija; značaj.

8. SUMMARY

The role of direct microscopy in diagnosis of tuberculosis

Research history: One of the biggest global problems of the modern world is tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis*. It is assumed that one in three people is infected with *Mycobacterium tuberculosis*, and every untreated person infects 10 – 15 people around them. Direct microscopic method, which is the fastest and the most effective technique in microbiology in detecting tuberculosis, presents high importance in treatment and prevention of tuberculosis.

Objectives: To determine the number of positive microscopic methods in relation to positive cultures; to determine the significance of the direct microscopic method in microbiologic diagnostics of tuberculosis as well as the sample quality assessment

Research outline: Retrospective research

Participants and methods: This retrospective study included archived data of the Department of Clinical Microbiology of General County Hospital Požega between 1st January and 31st December 2014. The research included 179 participants referred to bacteriological analysis for tuberculosis and 667 clinical samples. This research used conventional methods such as the direct microscopic method and cultivation.

Results: The frequency of tuberculosis infection in Požega-Slavonia County is 7.8%. There were 7.36% of positive direct microscopies and 6.3% of positive cultivations in 667 samples. The research showed that men are more often infected than women.

Conclusion: The number of identified positive microscopies in the researched area is among higher in Croatia. There are more positive microscopies than positive cultivations, which is not the case in other microbiologic centers for detecting tuberculosis. This research shows that the direct microscopic method is help, and not substitution for cultivation, which is still the golden standard in microbiologic detecting of TBC.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis diagnostics; direct microscopic method; cultivation; significance.

9. LITERATURA

1. Gandadharam PRJ i Jenkins PA. Mycobacteria: Basic Aspects. Chapmanand Hall, New York, 1997.
2. World Health Organisation. Global tuberculosis control. WHO report 2013. WHO/HTM/TB/2013.11. Geneva, WHO, 2013.
3. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2012. godinu. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2013.
4. Kalinić S, Mlinarić-Missoni E. Medicinska mikrobiologija i bakteriologija, 2. izdanje, Zagreb, Merkur A.B.D. 2005, 303-313
5. Mlinarić Galinović G, Ramljak Šešo M, i suradnici, Specijalna medicinska mikrobiologija i parazitologija, Zagreb, Merkur A:B:D:2003:157-162
6. Jurčević-Savičević A, Katalinić-Janković V, Gjenero-Margan I, i suradnici Epidemiological patterns of Tuberculosis in Croatia in the Period 1996-2005. Coll Antropol 2011;2:523-8
7. World Health Organisation. Global tuberculosis control. 2011. Geneva: World Health Organization; 2011.
8. Rieder HL. Epidemiologic basis of tuberculosis control. Paris; IUATLD; 1999.
9. Ministarstvo zdravlja i socijalne skrbi Republike Hrvatske i Hrvatski zavod za javno zdravstvo; Naputak za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze. Zagreb; 2010.
10. Agrons GA, Markowitz RI, Kramer SS. Pulmonary tuberculosis in children. Semin Roentgenol 1993;28:158-72.
11. Raviglione MC, o'Brien RJ. Tuberculosis. U: Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Harrison's principles of internal medicine. 16. Izdanje, New York: McGraw-Hill; 2005, str. 593-65.
12. Lonnroth K, Castro KG, Chakaya JM, i sur Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development. Lancet 2010;375:1814-29

13. Sneath HA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG Genus Mycobacterium Lehmann and Neumann 1896. In P.H.A. Sneath(ed): Bergeys manual of systematic bacteriology. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1986;1436-57.
14. Kolarić V, Juričevski I. Multirezistentna tuberkuloza. U: Popovi-Grle S. ur. Tuberkuloza- ponovni izazov na početku trećeg tisućljeća, Zagreb: Klinika za plućne bolesti „Jordanovac“, Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske, Institut Otvoreno društvo Hrvatska; 2004.
15. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. 4. Izdanje, Missouri: Sanders; 2011: 132,576-600
16. Kent PT, Kubica GP: *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*, Atlanta, 1985, U.S. Department of Health and Human Service, Public Health Service, Centers for Disease Control.
17. World Health Organization. Use of Liquid TB Culture and Drug Susceptibility Testing (DST) in Low and Medium Income Settings. Summary report of the Expert Group Meeting, Geneva, WHO, 2007.
18. Canetti G, Froman S, Grosset J i sur. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull WHO 1963; 29: 565–78.
19. Kalinić S i suradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2013; 160-170
20. Rapid implementation of Xpert MTB/RIF diagnostic test: technical and operational „HOW-to“; practical considerations. Geneva: World Health Organization, 2011; Dostupno na adresi: <http://wqplibdoc.who.int/publications/2011/9789241501569>
21. Banu S, Hossain S, Uddin M i sur. Comparison of macroscopic and microscopic assessment of specimens collected for the diagnosis of tuberculosis. The Open Infectious Disease Journal, 2012; 6:1-4
22. Khan MS, Dar O, Tahseen S. i sur. Judging respiratory specimen acceptability for AFB microscopy: visual vs. Microscopic screening. Tropical Medicine and International Health. 2009; 571-575.

23. Hepple P, Nquele P i sur. Direct microscopy versus sputum cytology analysis and bleach sedimentation for diagnosis of tuberculosis. *BMC Infectious Disease*. 2010, 10:276
24. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2013. godinu. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2014.

10. ŽIVOTOPIS

Opći podatci:

- Ime i prezime: Ljubica Farkaš
- Datum i mjesto rođenja: 17. listopada 1972. godine u Požegi
- Adresa stanovanja: V. Lisinskog 14, 34 000 Požega
- Telefon: +385 (98) 777 818
- E-mail: ljubica.farkas@po.t-com.hr

Obrazovanje:

- Osnovna škola „Josip Kolumbo“, Kutjevo, 1983. - 1987. g.
- Medicinska škola Ruđer Bošković, Osijek, 1987. - 1991. g.
- Medicinski fakultet u Osijeku, Sveučilišni preddiplomski studij biomedicinsko laboratorijskih tehnologija, 2010. - 2013. g.
- Medicinski fakultet u Osijeku, Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, 2013. - 2015. g.

Radno iskustvo:

- Opća županijska bolnica Požega, Odjel za kliničku mikrobiologiju i parazitologiju, 1995.-
- 2014. - položen stručni ispit za bacc. medicinsko laboratorijske dijagnostike u Ministarstvu zdravlja, Zagreb.

Posebna znanja i vještine:

- Znanje svjetskih jezika: engleski i njemački
- Poznavanje rada na računalu: Word, Excel, Power Point, Internet
- Položen vozački ispit B kategorije

11. PRILOZI

OPĆA ŽUPANIJSKA BOLNICA POŽEGA
 POŽEGA, Osječka 107
 Ur. broj: 02-7/39-5/1-2-2015
 Datum: 9. srpnja 2015. godine

Na temelju članka 69. Zakona o zdravstvenoj zaštiti (NN br. 150/2008, 71/2010, 139/2010, 22/2011, 84/2011, 12/2012, 35/2012 – Odluka USRH, 70/2012, 144/2012, 82/2013, 159/2013-Uredba, 22/2014- Odluka USRH i 154/2014 - Uredba), članka 37. Statuta Opće županijske bolnice Požega i članka 19. i članka 23. Poslovnika o radu Etičkog povjerenstva Opće županijske bolnice Požega, sukladno Odluci Sanacijskog vijeća Opće županijske bolnice Požega, urbroj: 01-51/17-1/16-1-2014 od dana 24. listopada 2014. godine, na tridesetdevetoj sjednici Etičkog povjerenstva Opće županijske bolnice Požega, održanoj dana 9. srpnja 2015. godine, jednoglasno je donesena sljedeća

ODLUKA

Etičko povjerenstvo Opće županijske bolnice Požega **ne nalazi etičkih zapreka i suglasno je s provedbom istraživanja** u Općoj županijskoj bolnici Požega „*Značaj direktne mikroskopije u mikrobiološkoj dijagnostici tuberkuloze*“, predlagateljice Ljubice Farkaš, univ. bacc. med. lab. diagn., zaposlene u Općoj županijskoj bolnici Požega, Odjelu za kliničku mikrobiologiju, a za potrebe diplomskog rada na sveučilišnom diplomskom studiju medicinsko laboratorijske dijagnostike Medicinskog fakulteta u Osijeku, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, pod mentorstvom doc.dr.sc. Suzane Bukovski Simonoski, docentice na Katedri za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

- Etičko povjerenstvo pri donošenju suglasnosti iz stavka 1. ove odluke razmatralo je:
- zamolbu predlagateljice od dana 7. srpnja 2015. godine, zaprimljenu dana 7. srpnja 2015. godine pod brojem: 01-1920/1-2015, s
 - planom provedbe istraživanja: uvodni dio, predviđeno trajanje istraživanje, očekivani početak-završetak, ustanova u kojoj bi se provodilo istraživanje, populacija, starosna dob ispitanika, metode rada, cilj rada, sažetak, način korištenja i iskazivanja podataka bez naznake osobnih podataka i mogućnosti zlouporabe podataka te bez kontakta s pacijentima.

Etičko povjerenstvo Opće županijske bolnice Požega izjavljuje da je njegov sastav i rad sukladan dobroj kliničkoj praksi, važećim zakonima i propisima u Republici Hrvatskoj i Poslovniku o radu Etičkog povjerenstva Opće županijske bolnice Požega.

Prilog i sastavni dio ove odluke je popis članova i zamjenika članova Etičkog povjerenstva Opće županijske bolnice Požega koji su jednoglasno donijeli ovu odluku.

Predsjednik Etičkog povjerenstva
 Opće županijske bolnice Požega:
 Prim. Ljubo Begić, dr. med.

OPĆA ŽUPANIJSKA BOLNICA POŽEGA
 POŽEGA, Osječka 107
 Ur. broj: 02-7/39-5/1-2-P-2015
 Datum: 9. srpnja 2015. godine

Temeljem članka 69. Zakona o zdravstvenoj zaštiti (NN br. 150/2008, 71/2010, 139/2010, 22/2011, 84/2011, 12/2012, 35/2012 – Odluka USRH, 70/2012, 144/2012, 82/2013, 159/2013- Uredba, 22/2014- Odluka USRH i 154/2014 - Uredba), članka 37. stavka 7. Statuta Opće županijske bolnice Požega i članka 3. i članka 9. Poslovnika o radu Etičkog povjerenstva Opće županijske bolnice Požega, sukladno Odluci Sanacijskog vijeća Opće županijske bolnice Požega, urbroj: 01-51/17-1/16-1-2014 od dana 24. listopada 2014. godine i stavku 4. Odluke Sanacijskog vijeća Opće županijske bolnice Požega, urbroj: 02-7/39-5/1-2-2015, od dana 9. srpnja 2015. godine s tridesetdevete sjednice Etičkog povjerenstva Opće županijske bolnice Požega, održane dana 9. srpnja 2015. godine, daje se

POPIS

članova i zamjenika članova Etičkog povjerenstva Opće županijske bolnice Požega koji su jednoglasno donijeli Odluku ur. broj: 02-7/39-5/1-2-2015, od dana 9. srpnja 2015. godine:

- Damir Ronko, dipl.iur., sudac Općinskog suda u Požegi – zamjenik člana,
- Doc.dr.sc. Zdravko Kolundžić, mag. logoped - član,
- Prim. Ljubo Begić, dr. med. spec. opće kirurgije, uže spec. digestivne (abdominalne) kirurgije – predsjednik,
- Mr.sc. Vladimir Dujmović, dr. med. spec. interne medicine, uže spec. kardiologije – zamjenik člana,
- Prim.mr. Marijana Tomić Rajić, dr. med. spec. pedijatrije, uže spec. pedijatrijske neonatologije – član,
- Mr.sc. Božidar Njavro, dr.med. spec. ginekologije i opstetricije, uže spec. uroginekologije – zamjenik člana i
- Sanja Mjertan, mag. iur. – član.

Ovaj popis članova i zamjenika članova Etičkog povjerenstva Opće županijske bolnice Požega, prilog je i sastavni dio Odluke ur.broj: 02-7/39-5/1-2-2015, od dana 9. srpnja 2015. godine.

Predsjednik Etičkog povjerenstva
 Opće županijske bolnice Požega:
 Prim. Ljubo Begić, dr. med.