Referentna laboratorija za *Campylobacter i Helicobacter* – veza između mikrobioloških laboratorija

Referent laboratory for *Helicobacter* and *Campylobacter* - a liaison between laboratories

Biljana Miljković-Selimović, Tatjana Babić
Referentna laboratorija za *Campylobacter* i *Helicobacter*
Institut za javno zdravlje Niš
Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Referentna laboratorija za *Campylobacter i Helicobacter*

- Odluka Ministra zdravlja Republike Srbije
- Član 82. Zakona o zdravstvenoj zaštiti (Službeni glasnik RS broj 107/05)
- Član 23. Zakona o državnoj upravi (Službeni glasnik RS broj 79/05 i 101/07)
- Rešenje o referentnim laboratorijama za kontrolu zaraznih bolesti br. 022-04-28/2008-07 od 20. 03. 2008. godine)
- Referentna laboratorija za *Campylobacter* i *Helicobacter*
- Centar za mikrobiologiju, Institut za zaštitu zdravlja, Niš

Campylobacter
Otkrivanje

- **1909. godina**
- Dva engleska veterinara, Mc Fadyean i Stockman, u pobačenim plodovima ovaca i krava otkrili mikroorganizam oblika zareza
- **1919. godina**
- Smith ispituje abortuse infektivne etiologije kod krava u SAD i izoluje (uz 'Bang-ov' bacil) bakteriju koju opisuje kao spirilum.
- Tokom završetka svoje studije, saznaje za istraživanja McFadyean-a i Stockman-a, i pretpostavlja da se radi o istoj bakteriji. To i potvrđuje sa Taylor-om i za nju predlaže naziv '*Vibrio fetus*'
- **1949. godina**
- Stegenga and Terpstra dokazuju patogenu ulogu *V. fetus venerealis* u enzootičnom sterilitetu krava
- **1931. godina**
- Jones et al. pripisuju zimsku dizenteriju teladi infekciji 'vibrionom' koji nazivaju *Vibrio jejuni*,
- **1944. godina**
- Doyle opisuje sličan mikroorganizam kod dizenterije svinja

Campylobacter

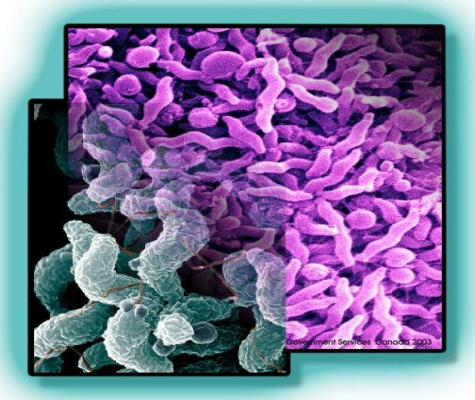
Otkrivanje

- **1886. godina**
- Theodor Escherich objavljuje niz članaka u “Muenchener Medizinische Wochenschrift” u kojima opisuje spiralne bakterije u kolonu dece umrle od bolesti koju je on nazivao ‘cholera infantum’
- Pokušaj kultivisanja na čvrstoj hranljivoj podlozi bio je neuspešan
- On zapaža i i spiralne mikroorganizme u uzorcima stolice dece koja pate od enterokolitisa, ali bez obzira na učestalost ovih nalaza smatra da spiralna bakterija nema značaja
- **1985. godina**
- Treći Internacionalni Workshop o *Campylobacter*-u održan u Otavi
- Manfred Kist prezentuje zapažanja Escherich-a, pošto su mnogo decenija bila nepoznata javnosti
- **2004. godina**
- “From Obscurity to Celebrity” Jean-Paul Butzler

Campylobacter

Otkrivanje

- Punih 40 godina ovaj mikroorganizam izučavao se samo u okviru veterinarske medicine mozda zbog pogresne pretpostavke Teodor-a Escherich-a, a verovatnije zbog nepostojanja adekvatnih tehnika izolacije



Campylobacter

Otkrivanje

- **1947. godina**
- Vinzent je prvi put objavio podatke o izolovanju vibriona iz krvi 3 gravidne žene sa febrilnošću nepoznate etilogije, koja se kod dve pacijentkinje završila abortusom
- **Maj, 1938. godine**
- Međutim i pre ovog saopštenja, u Ilinoisu, SAD dogodila se prva potpuno dokumentovana infekcija ljudi *Campylobacter*-om
- Epidemija dijareje usled konzumiranja mleka
- Koprokultura obolelih je bila negativna, mada je kod kod 31 osobe mikroskopski utvrđeno prisustvo bakterije koja je slična '*V. jejuni*'
- Kod 13 osoba ovaj mikroorganizam je izolovan iz krvi

Campylobacter

Otkrivanje

- **1957. godina**
- Elisabeth O` King opisuje ‘related vibrio’
- **1968. godina** (pulikovano 1972. godine)
- Butzler i Dekeyser uvode tehniku filtracije za izolovanje kampilobaktera, dokazuju da je osetljiv na eritromicin koji se može koristiti za terapiju kao i da tokom infekcije nastaje humoralni imunski odgovor
- E. O’King je **“insistirala na potrebi da se razvije metod za kultivisanje ovog mikroorganizna iz stolice. Nažalost, ovakav metod nije razvijen za njenog života, ali svejedno, njena vizija i marljivi rad su utrli put sledećim istraživanjima”**
- **1977. godina**
- Skirrow, prva selektivna podloga

Campylobacter
Taksonomija

- Sebald i Véron 1963. godine, za ovaj rod, predlažu naziv *Campylobacter*

INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, Jan. 1991, p. 88–103 Vol. 41, No. 1
0020-7713/91/010088-16$02.00/0
Copyright © 1991, International Union of Microbiological Societies

Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy: Emendation of Generic Descriptions and Proposal of *Arcobacter* gen. nov.

P. VANDAMME,[1]* E. FALSEN,[2] R. ROSSAU,[1]† B. HOSTE,[1] P. SEGERS,[1] R. TYTGAT,[1] AND J. DE LEY[1]

Laboratorium voor Microbiologie en Microbiële Genetica, Rijksuniversiteit Gent, B-9000 Ghent, Belgium,[1] and Culture Collection, Department of Clinical Bacteriology, University of Göteborg, S-413 46 Göteborg, Sweden[2]

Campylobacter

Taksonomija

- **1991. godina**
- Svi specijesi koji pripadaju rodu *Campylobacter* kao i srodne taksonomske vrste pripadaju istoj filogenetskoj grupi koja je nazvana rRNK superfamilija VI

- Familija *Campylobacteriaceae*
- Rodovi *Campylobacter* i *Arcobacter*
- Familija *Helicobacteriaceae*
- Rodovi *Helicobacter* i *Wolinella*

- U to vreme, u rodu *Campylobacter* se nalazilo 15 vrsta

Campylobacter
Nove vrste

- ***Campylobacter avium* , živina**
- Rossi M, Debruyne L, Zanoni RG, Manfreda G, Revez J, Vandamme P. Campylobacter avium sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. Int J Syst Evol Microbiol. 2009 Sep;59(Pt 9):2364-9.
- ***Campylobacter* canadensis** (*Grus americana*), **čaplja**
- Inglis GD, Hoar BM, Douglas P. Whiteside DP, Morck DW. Campylobacter canadensis sp. nov., from captive whooping cranes in Canada. Int J Syst Evol Microbiol. (2007), 57, 2636–44.
- ***Campylobacter* cuniculorum, zečevi**
- Zanoni RG, Debruyne L, Rossi M, Revez J, Vandamme P. *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits. Int J Syst Evol Microbiol. (2009) ;59(Pt 7):1666-71.
- ***Campylobacter hominis*, ljudi**
- Lawson AJ,1 On SLW, Logan JMJ, Stanley J. *Campylobacter hominis* sp. nov., from the human gastrointestinal tract. Int J Syst Evol Microbiol (2001), **51**, 651–660.

Campylobacter

Nove vrste

- ***Campylobacter insulinegriae,*** **morski sisari**
- Foster G, Holmes B, Steigerwalt AG, Lawson PA, Thorne P,Byrer DE, Ross HM, Xerry J, Thompson PM, Collins MD. *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals **Int J Syst Evol Microbiol** (2004), 54, 2369–2373.
- ***Campylobacter lanienae,*** **radnici u klanicama**
- Logan JMJ,Burnens, Linton D,1. Andrew J. Lawson AJ, StanleyJ. *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. Int J Syst Evol Microbiol (2000), 50, 865–872.
- ***Campylobacter peloridis*****, *Campylobacter lari-like strains isolated from shellfish and humans,*** **mekušci i ljudi**
- Debruyne L, On SL, De Brandt E, Vandamme P. Novel *Campylobacter* lari-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2009 May;59(Pt 5):1126-32.

Campylobacter
Termofilni kampilobakteri

- *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* i *Campylobacter upsaliensis*
- U svim starosnim grupama uzrokuju od 4-15% dijareja i važan su uzročnik putničke dijareje
- Dijareja može biti krvava, sa grčevima i abdominalnim bolom
- Kod osoba sa kompromitovanim imunskim sistemom, *Campylobacter* može da dospe u krvotok i da izazove infekcije opasne po život
- Izoluje se kod dece i mladih češće nego kod drugih starosnih grupa
- Gotovo svi oboleleli se oporave bez posebnog lečenja, ali je kod teških slučajeva lek izbora eritromicin

Campylobacter
Postinfekcijske sekvele

- Međutim, posle infekcije *C. jejuni* mogu nastati teške postinfekcijske komplikacije
  - Mišićno-skeletni sistem
    - Reaktivni artritis
  - Neurološke komplikacije
    - Postinfekcijska polineuropatija - Guillain-Barréov sindrom (GBS), Miller Fisherov sindrom (MFS) i srodne polineuropatije
  - Inflammatory bowel disease
- Na oko 1000 slučajeva oboljevanja od kampilobakterioze javlja jedan oboleli od GBS,
- Kod i do 40% svih obolelih od GBS prethodi infekcija *C. jejuni*
- Ako se bakterija izoluje ili se serološki potvrdi infekcija, neophodno je uključivanje antibiotika u terapiju

JOURNAL OF MEDICAL CASE REPORTS

Open Access Highly accessed Case report

Enteritis caused by *Campylobacter jejuni* followed by acute motor axonal neuropathy: a case report

Biljana Miljković-Selimović[1], **Dragana Lavrnić**[2], **Olga Morić**[3], **Lai-King Ng**[4], **Lawrence Price**[4], **Ljubica Šuturkova**[5], **Branislava Kocic**[1], **Tatjana Babić**[6], **Ljiljana Ristić**[6] and **Slobodan Apostolski**[2]

[1] Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of Niš, Bul Dr Z Đinđića, 81, 18000 Niš, Serbia

[2] Institute of Neurology, School of Medicine, University of Belgrade, Dr Subotića 8, 11000 Belgrade, Serbia

[3] Republic Institute of Public Health, Dr Subotića 5, 11000 Belgrade, Serbia

[4] National Laboratory for Enteric Pathogens, National Microbiology Laboratory, The Canadian Science Centre for Human and Animal Health, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 2R2, Canada

[5] School of Pharmacy, University of Skopje, Bul Krste Misirkov bb 91000 Skopje, Former Yugoslav Republic of Macedonia

[6] Institute of Public Health in Niš, Center for Microbiology, Bul Dr Z Đinđića, 50, 18000, Niš, Serbia

author email corresponding author email

Journal of Medical Case Reports 2010, **4:**101doi:10.1186/1752-1947-4-101

Published:31 March 2010

Campylobacter

- Kod ovog bolesnika sa AMAN, oblikom GBS, dokazan je enteritis izazvan *C. jejuni,* što ukazuje na blisku povezanost između bakterijske infekcije i teške akutne neuropatije
- Posle primenjene terapije koja je obuhvatala i antibiotik, bolesnik se potpno oporavio, uprkos tome što je kod neuroloških postinfekcijskih sekvela izazvanih *C. jejuni* slabija prognoza
- Stoga bi osim neuroloških ispitivanja trebalo sprovesti i specifična mikrobiološka i imunološka ispitivanja za postavljanje etiološke dijagnoze GBS
- Neophodna su dalja klinička, epidemiološka i mikrobiološka istraživanja prevalencije *C. jejuni* i njegovih HS serotipova kako u etiologiji GBS, tako i u etiologiji drugih post-infekcijskih sekvela

Campylobacter
Rezistencija na makrolide

- U nekim je zemljama zapažen trend povećana rezistencije prema makrolidima
- **SAD i Kanada**
- Prevalencija rezistencije *C. jejuni* prema eritromicinu kod izolata od ljudi, brojler pilića i stoke iznosi 10% ili manje
- Međutim, više od 40% sojeva *C. coli*, izolovanih kod ćurki i svinja rezistentno je na ovaj antibiotik
- **Afrika**
- Interesantno je da je izražena rezistencija prema eritromicinu zapažena kod izolata poreklom od ljudi, a niska i kod *C. jejuni* i *C. coli* izolovanih kod životinja koje se uzgajaju zbog hrane
- **Azija**
- Niska je rezistancija *C. jejuni* prema makrolidima, dok je *C. coli* na ovu klasu antibiotika izraženije rezistentan
- **Australija**
- Slično nalazu na drugim kontinentima, rezistencija prema makrolidima zapažena je uglavnom kod *C. coli* izolovanog kod svinja

Campylobacter
Rezistencija na fluorokvinolone (FQ)

- **SAD, Kanada i većina Evropskih zemalja**
- Brzo povećanje broja izolovanih sojeva rezistentnih prema fluorokvinolonima
- **Afrika i Azija**
- Dominira nalaz *Campylobacter-a* rezistentnog na FQ
- Na Tajlandu i u Hong-Kongu, stopa rezistencije veća je od 80%
- **Australija i Novi Zeland**
- Stopa *Campylobacter* rezistentnih na FQ značajno je niža nego u drugim regionima

Campylobacter

Rezistencija na fluorokvinolone

- Približno 25% lekova koji se koriste u vetereinarskoj medicini su FQ. Koriste se u uzgoju živine za kontrolu respiratornih infekcija. Enrofloksacin se u Holandiji koristi u veterinarskoj medicini od 1987. godine
- FQ se ne koriste u toj meri u uzgoju svinja kao kod uzgoja živine, pa je to verovatno razlog što je % sojeva *Campylobacter jejuni/coli rezistentnih na* FQ manji kod svinja nego kod živine
- U mnogim zemljama, nekoliko FQ se primenjuje u lečenju životinja koje se koriste u ishrani: živina, stoka, svinje i riba.
- 1997. godina
- Procenjeno je da je u svetu upotrebljeno 120 tona FQ u uzgoju životinja
- A u lečenju ljudi više od 800 tona FQ
- Eksperimentalno je dokazano da tretiranje pilića kolonizovanih kampilobakterom indukuje reziostenciju prema FQ

Campylobacter

Rezistencija na tetracikline

- Rezistencija prema tetraciklinu kod *Campylobacter* spp. opisana je u mnogim zemljama
- Međutim, postoje velike geografske razlike u distribuciji profila osetljivosti
- Selekcija i širenje rezistentnih sojeva termofilnih kampilobaktera kod ljudi pripisuje nekontrolisanoj primeni u veterinarskoj medicini kao promotera rasta, u profilaksi i terapiji

Miljković-Selimović B, et al. Vojnosanit Pregl 2009; 66(7): 522–526.

ORIGINAL ARTICLE

UDC: 615.015.8

Antimicrobial susceptibility profiles of thermophilic campylobacters isolated from patients in the town of Niš

Profil osetljivosti termofilnih kampilobaktera izolovanih kod obolelih u Nišu

Biljana Miljković-Selimović*, Tatjana Babić†, Branislava Kocić*, Ljiljana Ristić†

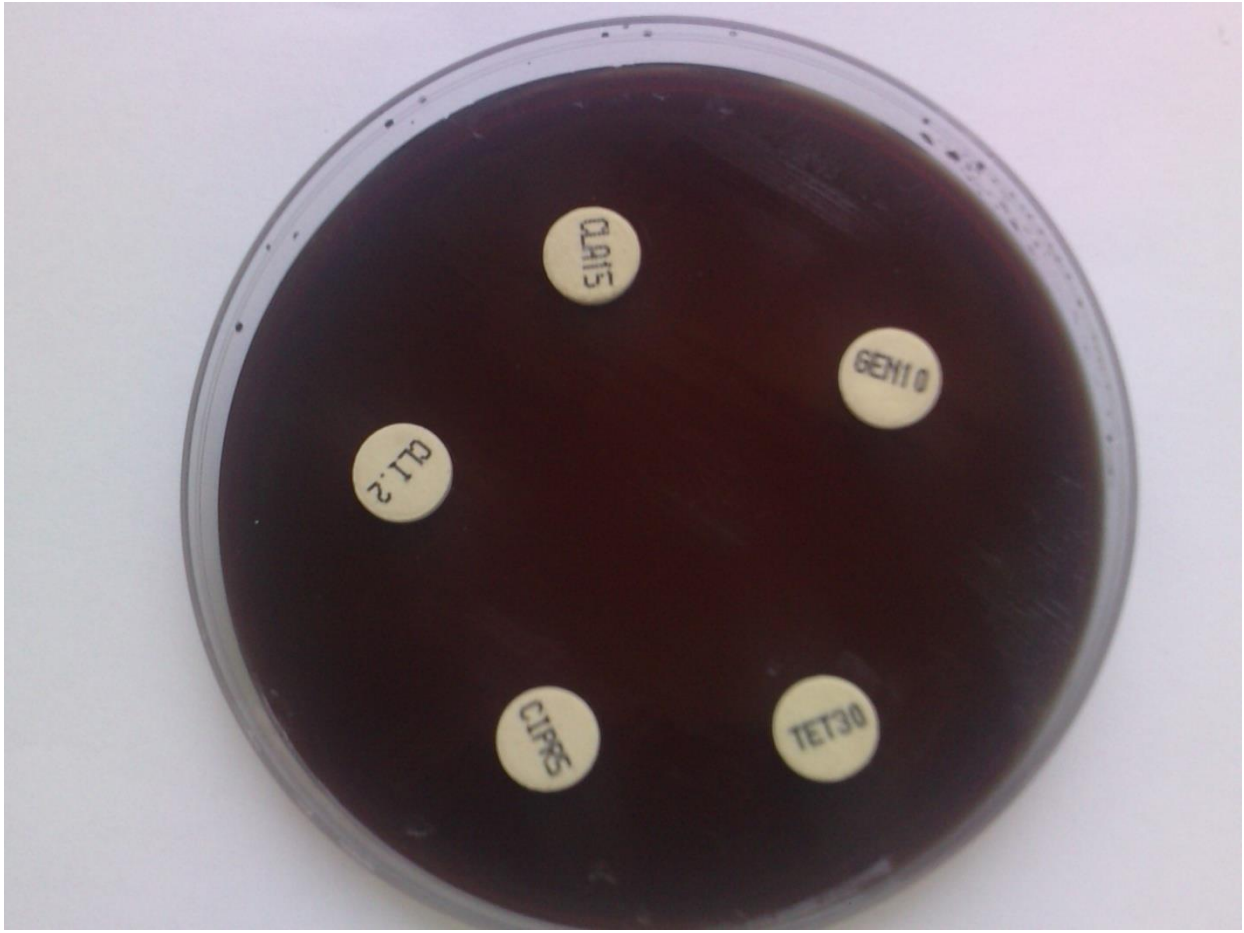
University of Niš, *School of Medicine, †Institute of Public Health, **Niš, Serbia**

Antimicrobial susceptibility profiles of thermophilic campylobacters isolated from patients in the town of Niš

Profil osetljivosti termofilnih kampilobaktera izolovanih kod obolelih u Nišu

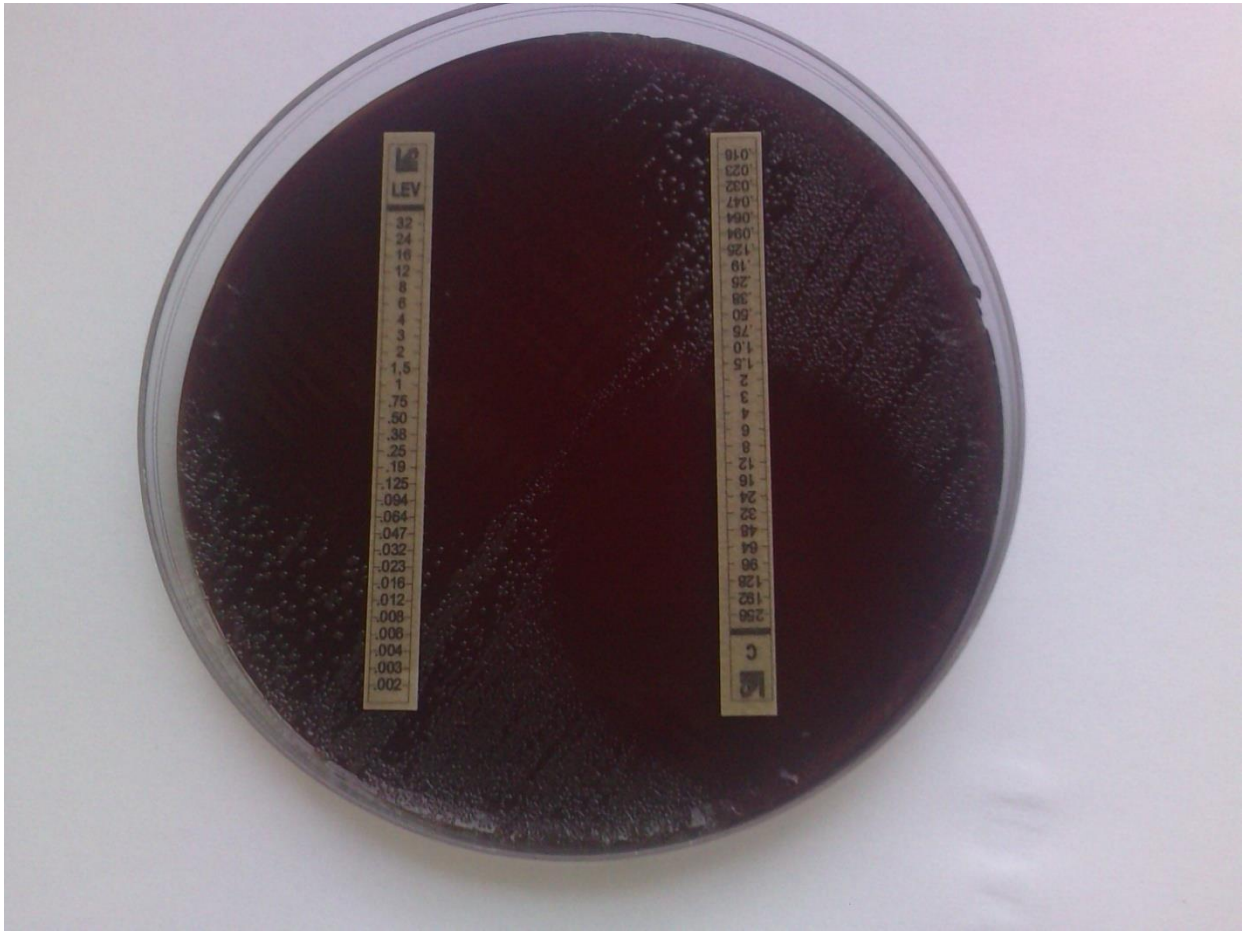
- Kod ispitivanih sojeva nije zabeležena rezistencija na gentamicin i hloramfenikol
- 2,4% sojeva bilo je rezistentno na eritromicin
- 9,9% sojeva bilo je rezistentno na tetraciklin
- 29,8% sojeva bilo je rezistentno na ciprofloksacin, a 33,3% na nalidiksinsku kiselinu
- Nije bilo razlike u pojavi rezistencije kod izolata koji su doveli samo do dijareje i kod onih koji su izazvali dijareju praćenu postinfekcijskim sekvelama
- Eritromicin je i dalje antibiotik izbora u lečenju enterokolitisa izazvanog kampilobakterom
- Gentamicin je antibiotik koji se može primenjivati kada je neophodna parenteralna terapija
- Otpornost na tetraciklin i, naročito, ciprofloksacin ukazuje na neophodnost testiranja osetljivosti kampilobaktera

Campylobacter
Osetljivost prema gentamicinu



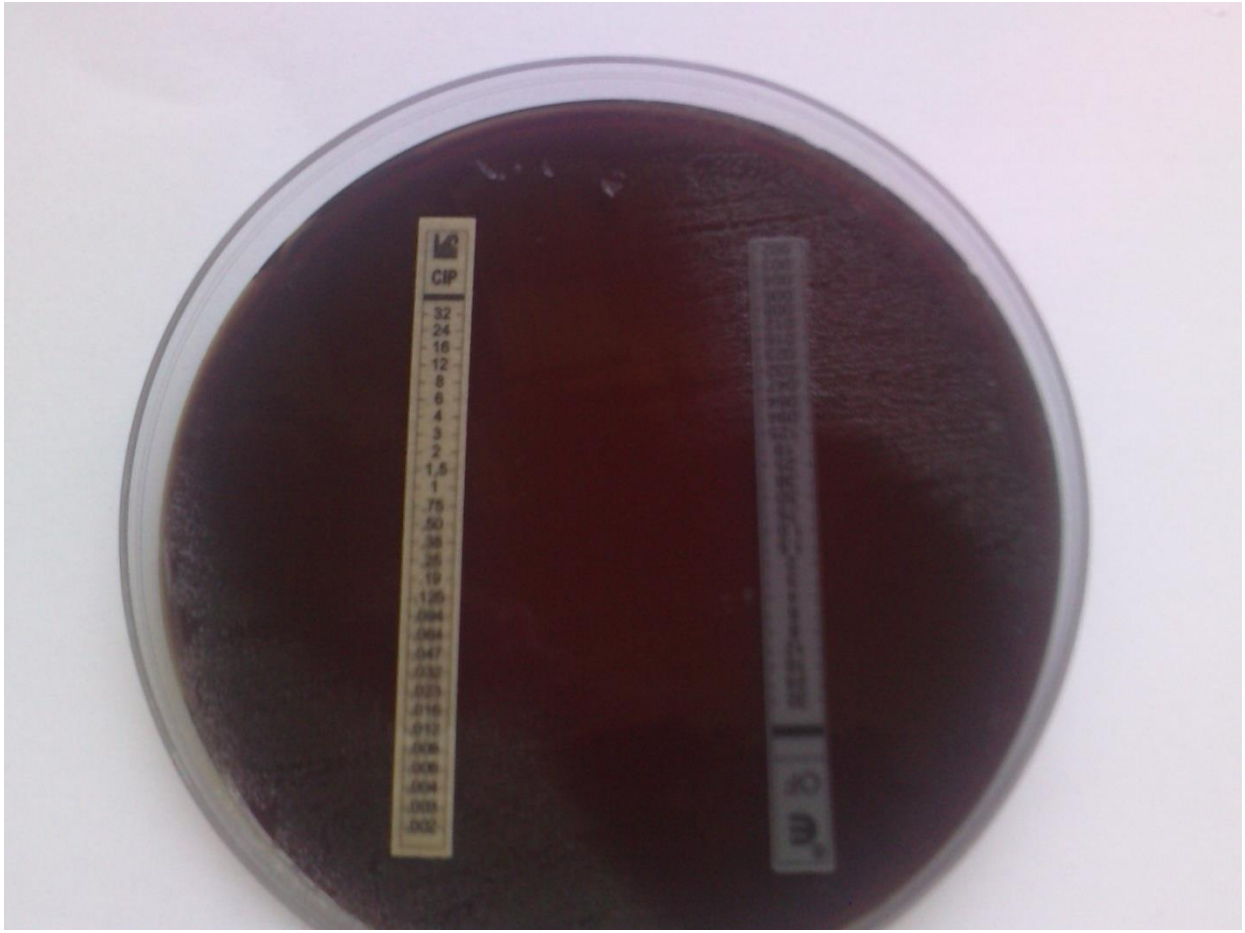
Campylobacter

Osetljivost prema hloramfenikolu i levofloksacinu



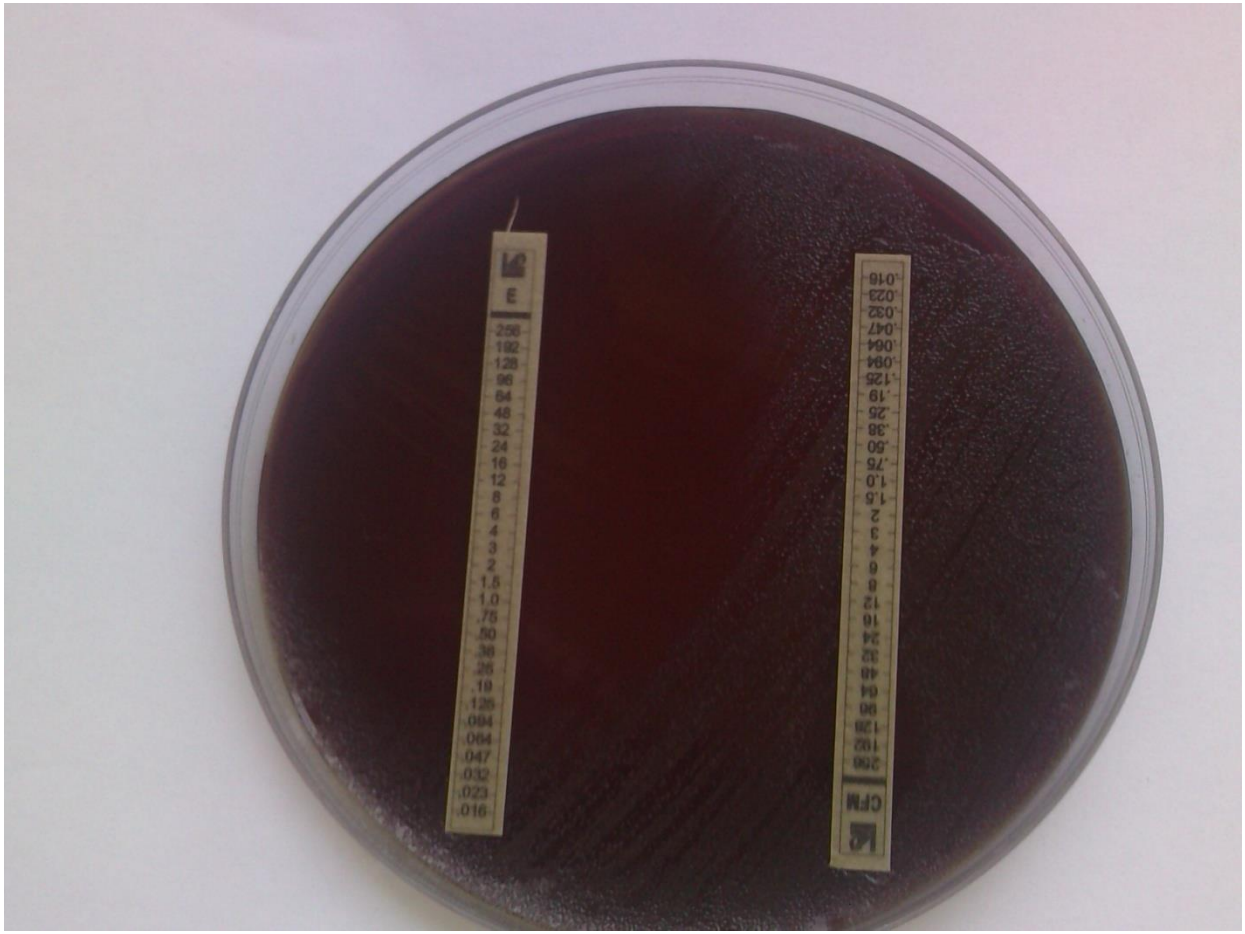
Campylobacter

Osetljivost prema ciprofloksacinu i ofloksacinu



Campylobacter

Osetljivost prema eritromicinu, rezistencija prema cefifksimu



Campylobacter
Genom i genotipizacija

- **2000. godina**
- Genom *C. jejuni* je sekvencioniran (Parkhill et al., 2000).
- Njegova veličina iznosi oko 1,7 Mb sa relativno niskim sadržajem GC od 30,6%.
- Poseduje veliki procenat sekvenci koje kodiraju proteine
- Različite tehnike fingerprintiga DNK mogu se koristiti za utvrđivanje razlike između izolata i ispitivanje genetske sličnosti u prirodnoj populaciji
- Rezultati daju važne informacije o ekološkoj povezanosti i interakcijama kod ispitivanih populacija
- Metode genotipizacije često se koriste za epidemiološka istraživanja

Campylobacter

Genotipizacija - metode

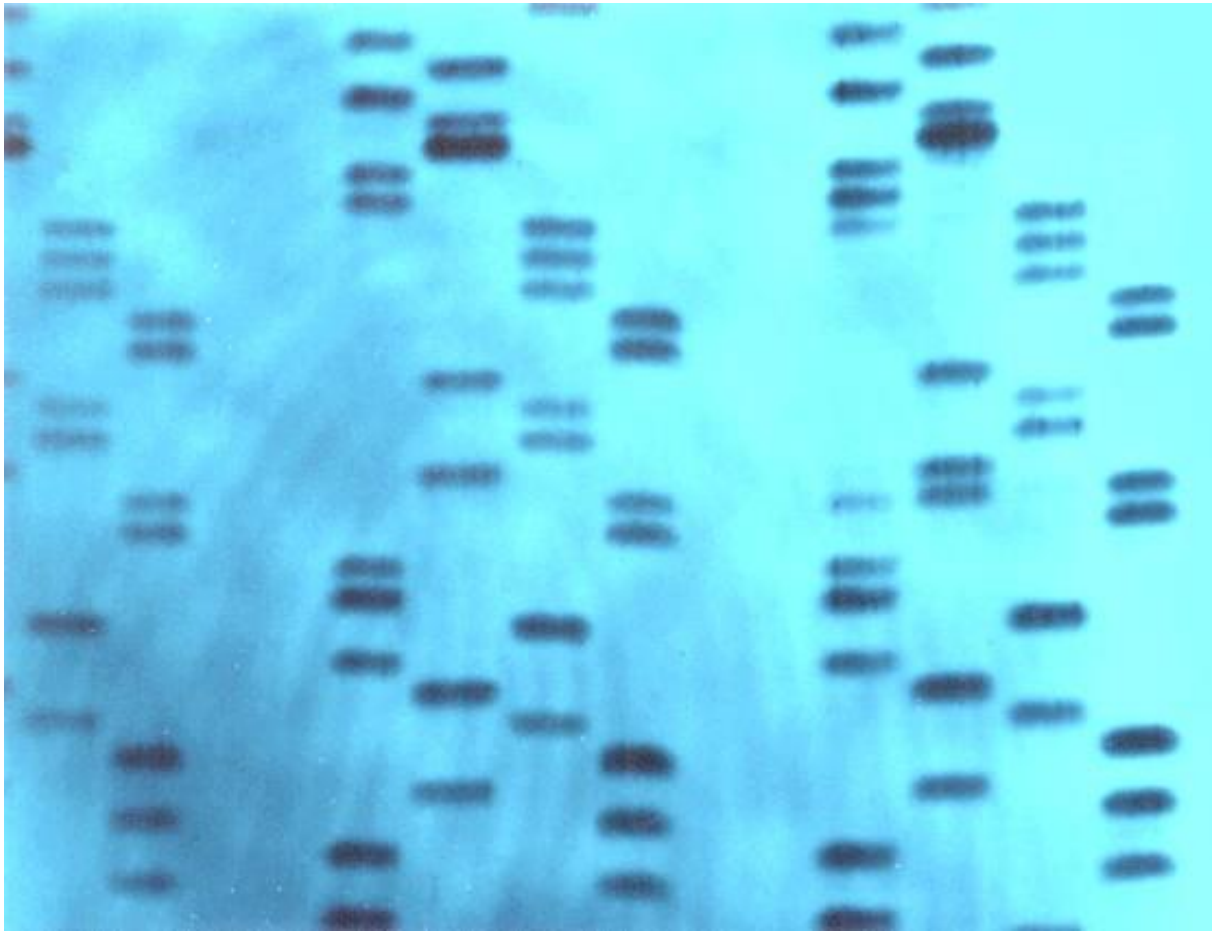
- Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)
- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)
- Flagellin Gene Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (*flaA*-RFLP)
- Multi Locus Sequence Typing (MLST)
- DNA Microarray with Comparative Genomic Hybridization (CGH)

Campylobacter

Genotipizacija - metode

- **Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**
- Najpre se vrši digestija celokupne DNA restrikcionim enzimima "rare cutting" i nastaje relativno mali broj fragmenata genoma koji se mogu upoređivati, a čija veličina iznosi od 50 to 500 Kb.
- Fragmenti se razdvajaju u polju pulsirajuće struje specijalnom metodom elektroforeze, PFGE, tako da se veliki restrikcioni fragmenti DNK nežno orijentišu u matriksu gela agaroze
- Dobijeni profil može da čini 6 do 15 traka
- Restrikcioni enzimi koji se koriste u genotipizaciji *Campylobacter-a* mogu biti: *Sma*I, *Kpn*I, *Bam*HI, *Bss*HII, *Xho*I, *Sal*I.
- Metod ima izraženu reproducibilnost, a standardizovani protokol sa *Sma*I može se naći on-line na Campynet (http://www.campynet.vetinst.dk)
- Međutim, neki sojevi se ne mogu tipizirati na ovaj način, verovatno zato što je njihova DNK zaštićena na mestima aktivnosti DNaze

Campylobacter
Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

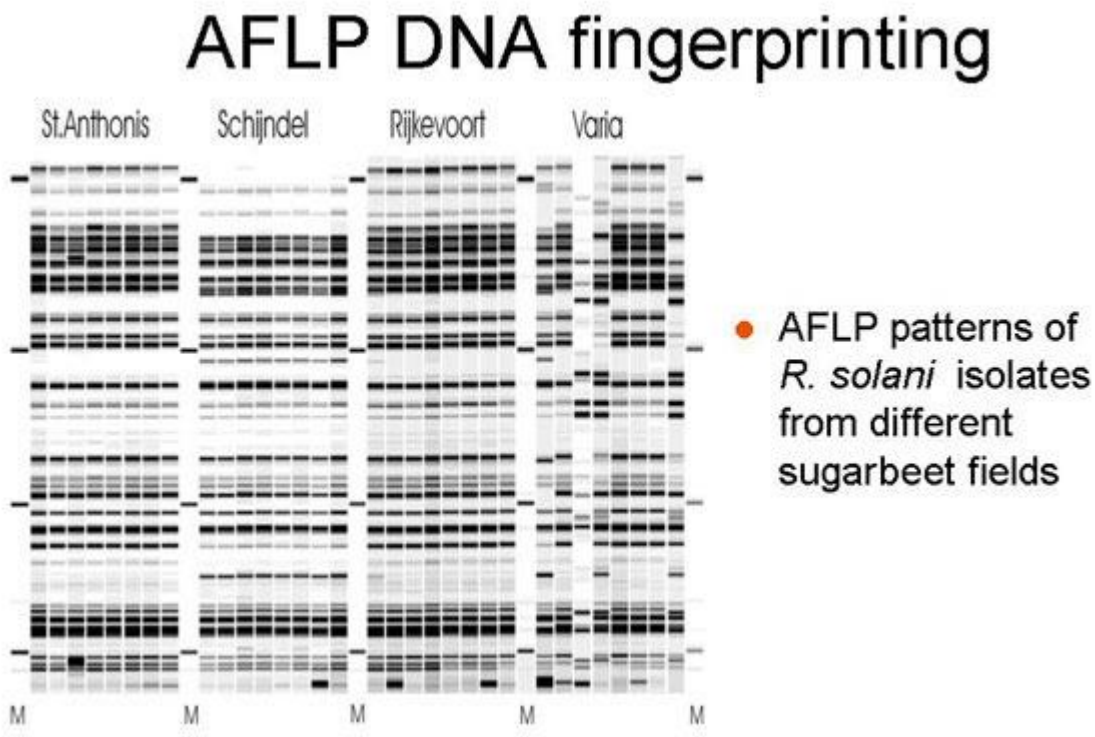


Campylobacter

Genotipizacija - metode

- **Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**
- I ovaj metod kao i određivanje profila PFGE-DNK, detektuje polimorfizam celog genoma, ali drugačijim pristupom
- Ciljna DNK se obrađuje sa 2 različita restrikciona enzima, “rare cutter” i “frequent cutter”, a specijalno dizajnirani "adaptor oligonucleotides“ vezuju se za lepljive krajeve DNK
- PCR se onda koristi da bi se umnožila podgrupa fragmenata, koji se zatim razdvajaju i detektuju na pogodan način – obično sistemom za sekvencioniranje gena
- Profili se sastoje od 20 do 80 traka čija veličina varira od 35 do 80bp
- AFLP prikazuje stabilne genotipove pošto je neosetljiv na rearanžiranje gena, a sama metoda ima izraženu moć diskriminacije
- Kada se DNK jednom izoluje, metod je veoma efikasan posebno ako se primenjuju moderni multi-kapilarni skvenceri

Campylobacter
Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)



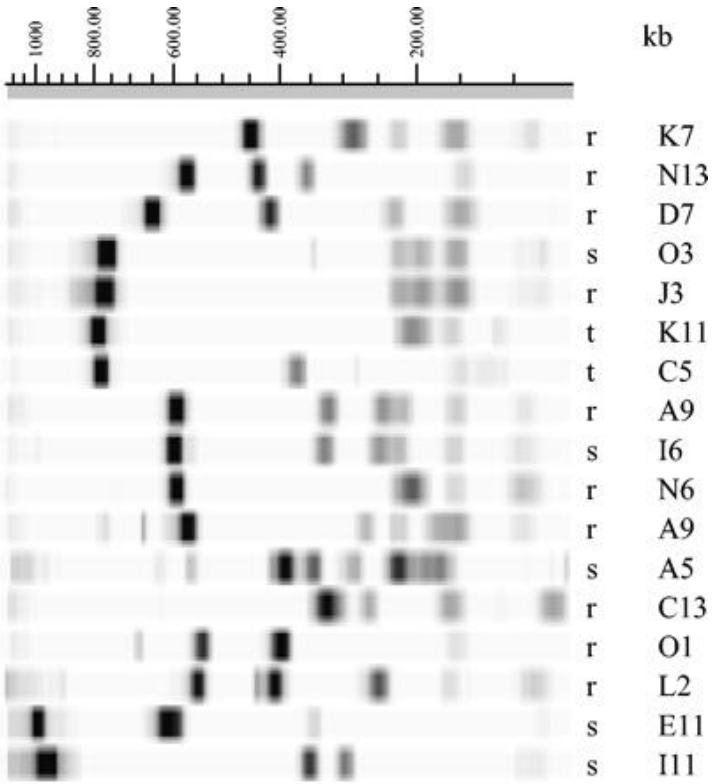
- AFLP patterns of *R. solani* isolates from different sugarbeet fields

Campylobacter

Genotipizacija - metode

- **Flagellin Gene Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (*flaA*-RFLP).**
- Kod ove metode vrši se amplifikacija gena za flagellin A primenom PCR i naknadna digestija PCR proizvoda restrikcionim enzimom
- Razlike između sojeva se detektuju kada se fragmenti razdvoje elektroforezom i vizuelizuju pošto razlike u distribuciji mesta restrikcije kod *fla* gena između sojeva daju fragmente različitih veličina i stoga različiti profil traka
- Ova metoda ispituje polimorfizam u jednom genu, za razliku od PFGE i AFLP kod kojih se razmatra celi genom
- *fla*-tipiziranje se pokazalo pogodnim za kratkotrajna istraživanja, ali usled rekombinacija između *flaA* gena različitih sojeva i između *flaA i flaB* gena kod pojedinih sojeva, ova metoda se ne smatra pogodnom za dugotrajna istraživanja

Campylobacter
Flagellin Gene Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (*flaA*-RFLP)



flaA profili izolata *C. jejuni* iz uzoraka vode

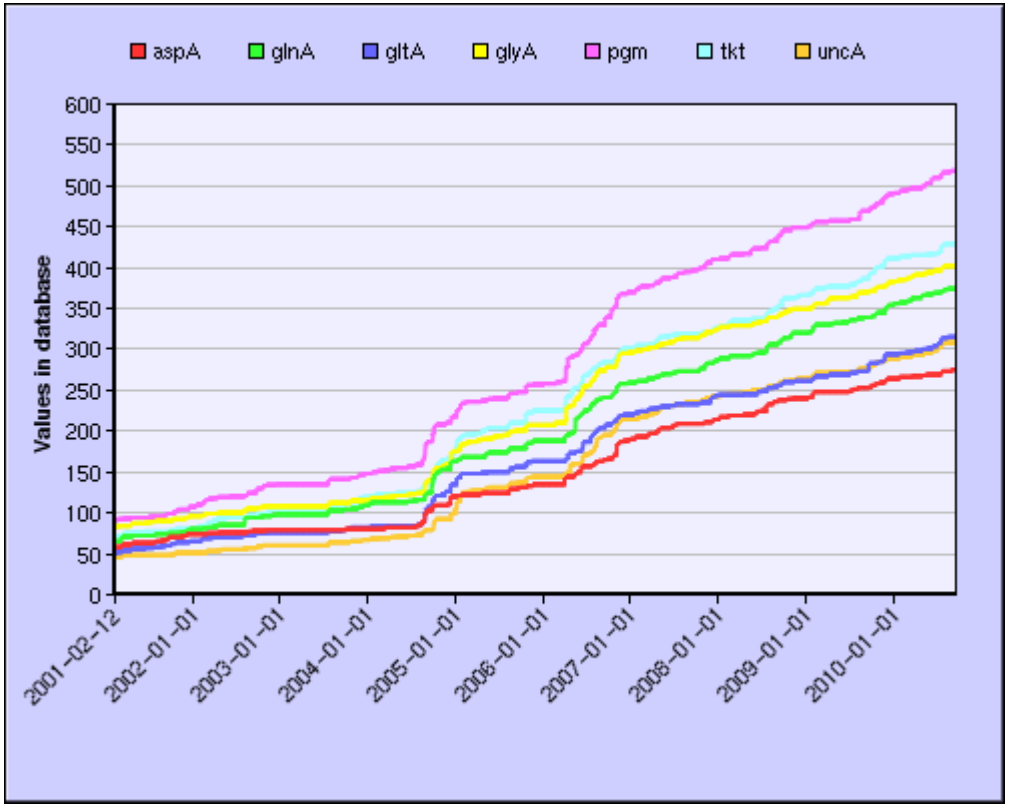
Campylobacter

Genotipizacija - metode

- **Multi Locus Sequence Typing (MLST)**
- Ovaj metod opisuje bakterijske vrste korišćenjem sekvenci unutrašnjih fragmenata **sedam** "housekeeping" gena
- Primenom automatskog DNK sevencera, skvenciraju se fragmenti veličine oko 450 do 500 bp oba DNK lanca
- Za svaki "housekeeping" gen, **različite sekvence** prisutne u bakterijskom specijesu označavaju se kao **različiti aleli**, a za svaki izolat, aleli svih sedam lokusa definišu **profil alela** ili **tip**
- Prednost MLST je u tome da su podaci o sekvencama veoma tačni, a da se profili alela mogu lako upoređivati preko interneta
- Izolati se mogu precizno opisivati čak i kada se ne mogu kultivisati iz kliničkog materijala
- U bazi podataka MLST nalaze se podaci tipiziranja oko 3000 izolata kampilobaktera koji su predstavljeni sa oko 1600 različitih sekvencijskih tipova

Campylobacter

Multi Locus Sequence Typing (MLST)



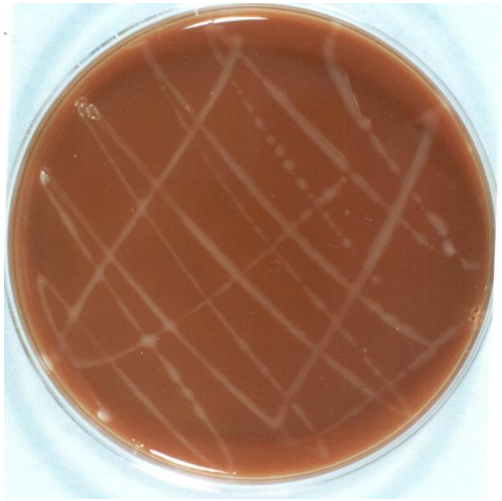
Campylobacter

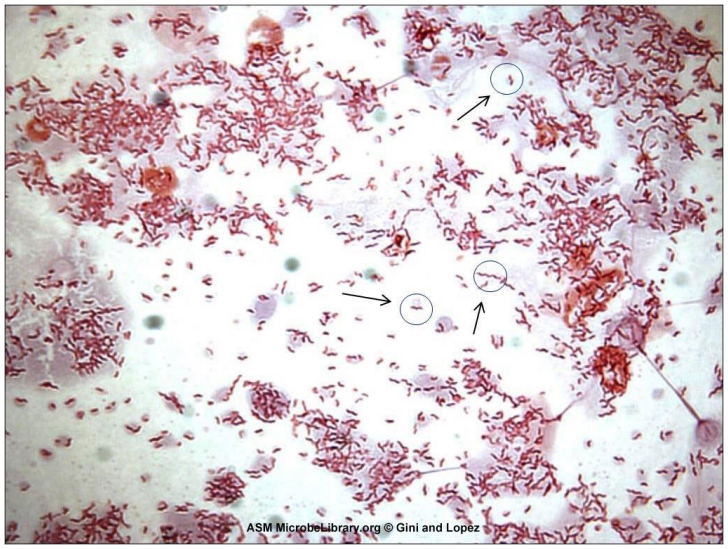
Genotipizacija - metode

- **DNK “Microarray” sa komparativnom hibridizacijom genomske DNK**
- Tehnika ispitivanje profila ekspresije genaje naziva se “microarray” tehnologija - „DNK chip“
- Najpre se izoluje se iRNK, sa sledstvenom sintezom cDNK
- Prvi lanac cDNK se obeleži
- Obeležena cDNK hibridizuje sa nukleotidima (poznate strukture) koji se dobijaju komercijalno
- Ako dođe do prepoznavanja segmenata gena, javlja se hibridizacija, koja se beleži i upoređuje sa drugim uzorcima
- Podaci dobijeni u različitim laboratorijama se mogu relativno lako upoređivati

Campylobacter
Mikrobiološka dijagnoza

- **IZOLOVANJE *Campylobacter-a***
- **Bolesnički materijal i hranljive podloge**





Campylobacter
Hranljive podloge

- **Stolica**
- *Campylobacter* se izoluje na:
- Beskrvnim selektivnim podlogama - mCCDA zato što na njemu rastu i *C. fetus*, *C. jejuni* i *C. coli* i *C. lari*.
- Selektivnim podlogama sa krvlju (po Skirrow-u, Butzler-u, Blaser-u itd.) na kojoj očekujemo *C.fetus* (ređe), *C. jejuni* i *C. coli*

Campylobacter
Zasejavanje

- Jedan materijal se zasejava na jednu ploču

Campylobacter

Hranljive podloge

- **Krv**
- Materijal se zasejava na neselektivnu obogaćenu podlogu
  - krvni agar sa 5% ovčije krvi
  - Columbia-krvni agar
  - Brucella-krvni agar
- Jedan materijal se zasejava na jednu ploču

Campylobacter

Hranljive podloge

- **Drugi materijali**
- Sterilan materijal se zasejava na neselektivnu obogaćenu podlogu
  - Krvni agar sa 5% ovčije krvi
  - Columbia agar
  - Brucella agar
- Nesterilni uzorci se zasejavaju na
  - selektivnu obogaćenu podlogu sa krvlju (po Skirrow-u, Butzler-u, Blaser-u, itd)
  - ili na beskrvnu podlogu mCCDA

Jedan materijal se zasejava na jednu ploču

Campylobacter
Uslovi za inkubaciju

- Mikroaerofilni uslovi
  - 5 % kiseonik
  - 10% CO_2
  - 85% azot
- Kesice za mikroaerofiliju u loncu za anaerobe
- Sistem evakuacije i zamene mešavinom gasa u loncu: 10% CO_2, 10% H_2, 80% N_2, što daje mikroaerofilnu atmosferu
- Plastične kese sa generatorima za mikroaerofiliju

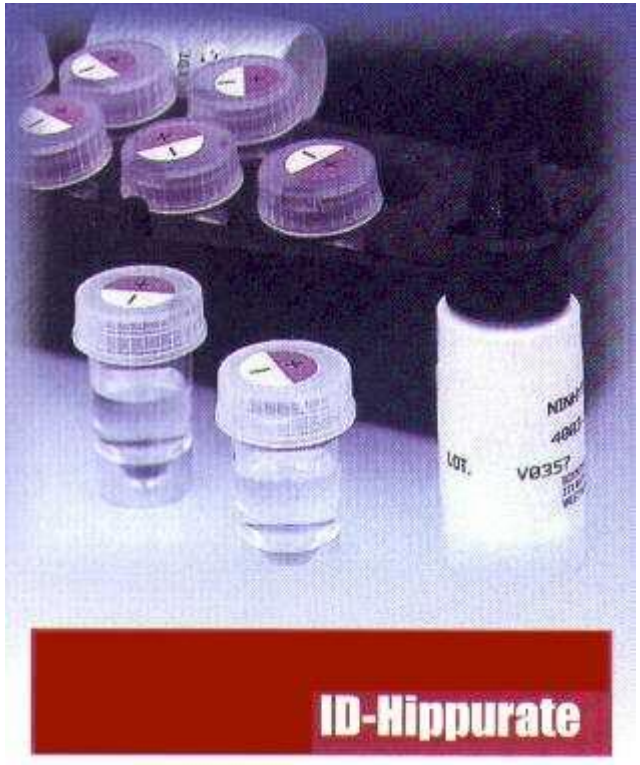
Campylobacter
Uslovi za inkubaciju

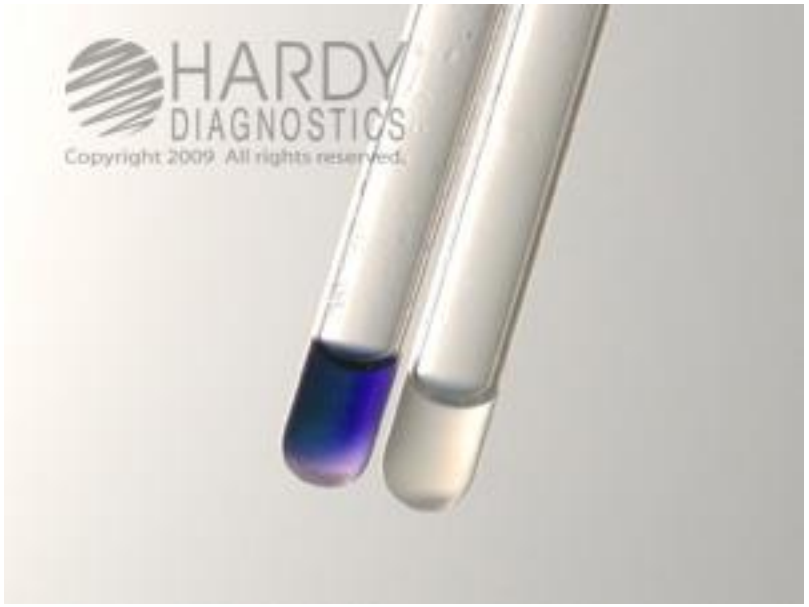
- Treba koristiti kesice za mikroaerofiliju koje stvaraju H_2 i CO_2 i sadrže katalizator
- Ako ne sadrže katalizator on se posebno stavlja u lonac
- Svaki put kada se lonac otvori stavlja se nova kesica
- Prema nekim autorima, ne stavlja se više od 6 ploča u lonac
- Inkubacija se vrši na temperaturi od 37^{o}C

Campylobacter
Biohemijske osobine

Mikroorganizam	Katalaza	Oksidaza	Hidroliza hipurata	Hidroliza indoksil actetata	Osetljivost na nalidiksinsku kiselinu	Osetljivost na cefalotin
C. jejuni	+	+	+	+	**S**	**R**
C. coli	+	+	-	+	**S**	**R**
C. lari	+	+	-	-	**R**	**R**
C. fetus	+	+	-	-	**Varijabilno**	**S**

Campylobacter
Hidroliza hipurata

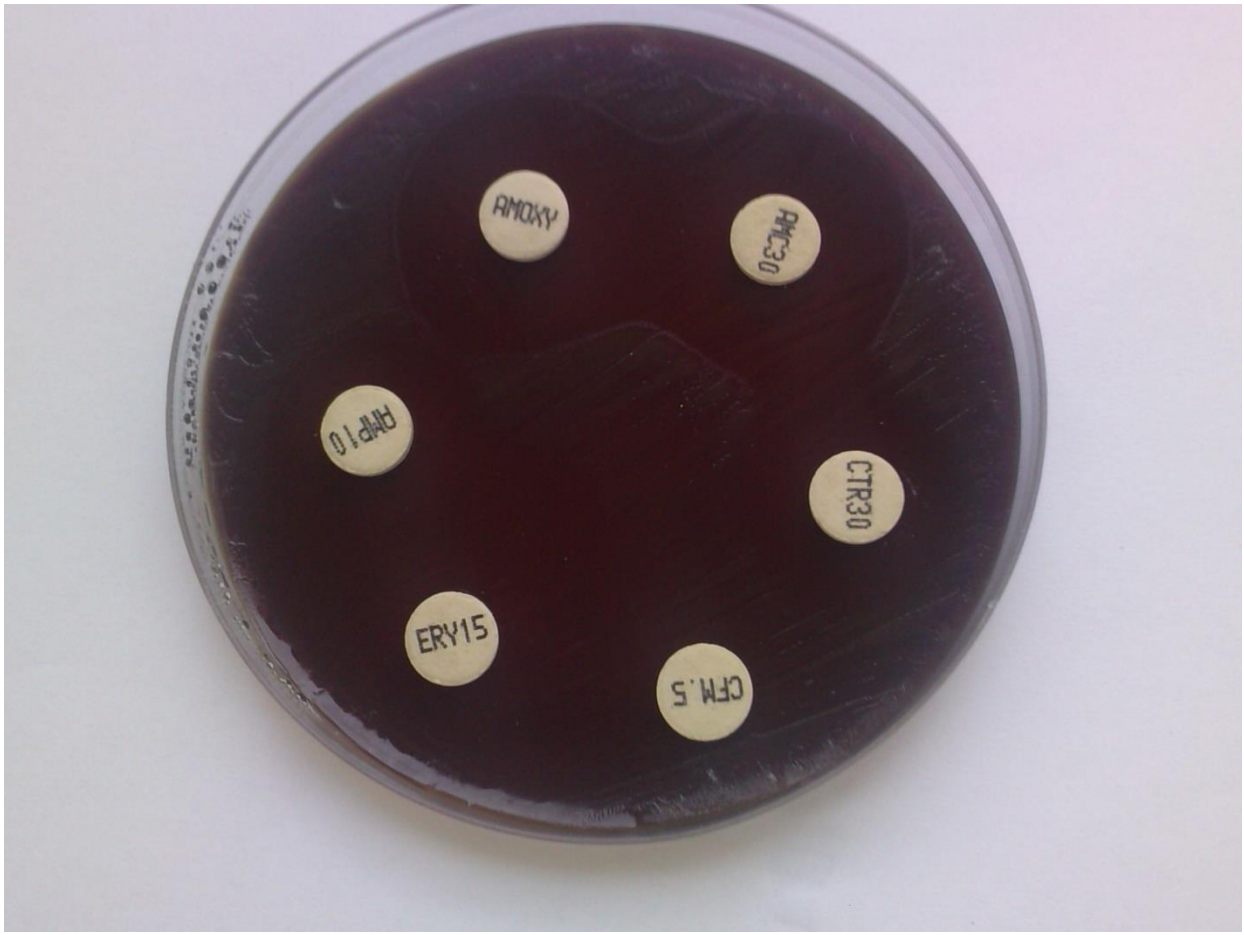




Campylobacter
Ispitivanje osetljivosti

- Disk difuzija - Metoda po Kirby-Bauer-u
- Neselektivna podloga sa 5% krvi
  - Mueller-Hinton-ov agar sa 5% ovčije krvi, prema CLSI
- Terapeutska primena
  - Eritromicin (15 µg), ciprofloksacin (5 µg)
- Za identifikaciju
  - Nalidiksinska kiselina (30 µg) i cefalotin (30 µg)
- Dovoljna je jedna Petri-šolja za četiri tablete

Campylobacter
Ispitivanje osetljivosti



Campylobacter
Čuvanje sojeva

- Izolovani *Campylobacter* se subkultiviše radi dobijanja čiste kulture i umnožavanja, na jednoj neselektivnoj i jednoj selektivnoj podlozi
- Zatim se nekoliko punih eza kulture prenese u po dve male epruvete sa zatvaračima ili ependorfice sa po 1 ml moždano srčanog infuziong bujona (MSI; Brain Hart Infusion broth - BHI) sa 30% glicerola.
- Kultura se dobro suspenduje (na "vortexu"), zatvori i odloži na -20^{o}C ili još bolje na -70^{o}C,
- Na -20^{o}C kulture se ne čuvaju duže od tri meseca.
- Kulture se šalju svaka tri meseca, kvartalno

Campylobacter
Osvežavanje sojeva

- Epruvete se izvade i odlede se na sobnoj temperaturi.
- Potom se ezom prenese kultura na jednu selektivnu i jednu neselektivnu hranljivu podlogu
- Koriste se isključivo sveže ploče
- Ako nema porasta posle zasejavanja, celokupna preostala količina tečne kulture se izlije na jednu ploču i razvuče ezom

Campylobacter
Transport sojeva

- Amies-ova, Stuart-ova, Preston-ova, Wang-ova, modifikovana Willkins-Chalgran-ova podloga ili, eventualno, MSI bujon sa 30% glicerola
- Podloge se pre upotrebe čuvaju na +4^{o}C
- Sa podloge na kojoj je osvežena kultura, brisom se pokupi najveća moguća količina kulture, inokulira se transportna podloga, bris se zalomi pincetom i ostane u polučvrstoj podlozi
- Epruveta se zatvori i zapečati.
- Ako se koriste Wang-ova i Willkins-Chalgran-ova podloga, posle inokulacije, podloge mogu da se inkubiraju preko noći na 37^{o}C
- Transport se vrši se ekspres-poštom ili ako postoji komunikacija sa IZJZ, Niš, u ručnom frižideru, kolima

Campylobacter
Aktivnosti referentne laboratorije

RL obavlja poslove prema navedenom rešenju i u skladu sa zakonom

1. Kultivacija uzoraka (stolica, krv, drugi materijali)
2. Izolovanje metodom filtracije
3. Izolovanje metodom obogaćivanja rasta
4. Identifikovanje kampilobaktera
5. Serološko ispitivanje obolelih, kao i osoba sa postinfekcijskim sekvelama
6. Tipizacija izolata u slučaju epidemija

Campylobacter

Aktivnosti referentne laboratorije

7. Pripravnost u smislu snabdevanja laboratorija u institutima/zavodima za javno zdravlje dijagnostičkim sredstvima po potrebi u slučaju epidemijske pojave kampilobakterioze podlogama za transport uzoraka (Cary Blair), podlogama za čuvanje i transport izolata
8. Održavanje zbirke kultura (referentne, domaće) kampilobaktera
9. Ispitivanje osetljivosti kampilobaktera na antibiotike
10. Ispitivanje produkcije beta laktamaza kampilobaktera
11. Prikupljanje anamnestičkih i epidemioloških podataka
12. Uspostavljanje laboratorijske baze podataka

Campylobacter

Aktivnosti referentne laboratorije

13. Izrada i distribucija godišnjeg izveštaja o teritorijalnoj rasprostranjenosti primoizolata *Campylobacter-a* humanog porekla
14. Transport uzoraka kampilobaktera u supranacionalnu laboratoriju
15. Uvođenje novih metoda – molekularna identifikacija PCR i tipizacija PFGE epidemijskih sojeva
16. Stručna mišljenja, vodiči, predavanja
17. Obuka lekara
18. Prezentacija izveštaja i stručnih uputstava
19. Pružanje stručnih saveta i konsultacije

Campylobacter

Aktivnosti refrentne laboratorije

- RL sarađuje sa državnim i privatnim mikrobiološkim laboratorijama
- u institutima/zavodima za javno zdravlje
- u bolničkim
- i u veterinarskim ustanovama na teritoriji Republike Srbije

INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE NIŠ
Bulevar dr Zorana Đinđića 50
18 000 Niš, Srbija
Tel. 018/4226-448, 4226-384 Telefax 018/4225-974
www.izjz-nis.org.rs

Referentna laboratorija za kampilobakter i helikobakter
Tel. 018 4226-448, 4226-384 lok. 179
e-mail: mikrobiologija@izjz-nis.org.rs

Uput za slanje kultura *Campylobacter*-a

Laboratorijski broj RL:

PODACI O POŠILJAOCU

Naziv ustanove_____
Adresa, Opština_____
Telefon ustanove_____
Identifikacioni broj uzorka_____

PODACI O PACIJENTU

Ime: _____Prezime:_____Datum rođenja: ___/___/___
Matični broj_____ br kartona_____
Pol: ○ m ○ ž
Pacijent: ○ bolnički ○ vanbolnički
Telefon:_____
Mesto stanovanja: ○ grad ○ selo
Putovanje u inostranstvo u poslednjih 15 dana:
○ Ne ○ Da Odredište: _____

PODACI O UZORKU

Datum uzorkovanja: ___/___/____
Datum slanja u Referentnu laboratoriju:___/___/_____
Poreklo izolata:

?Humani ?Feces ?Krv ?Drugo ?Specifikovati _____

?Animalni ?Hrana ?Okolina ?Drugo ?Specifikovati _____

KLINIČKI I EPIDEMIOLOŠKI PODACI

?Dijareja ? Vodenasta dijareja ? Krv u stolici ? Povraćanje

? Povišena temperatura ___^{0}C ? Abdominalni bolovi ? Asimptomatski
? Bolovi u zglobovima ? Bolovi u mišićima ? Slabost mišića ruku
?Slabost mišića nogu ? Drugo ? Specifikovati _____
?Antibiotska terapija ? Specifikovati _____

Vrsta antibiotika _____ doza _____ trajanje terapije_____(dana)

? Epidemija ? Porodična epidemija ? Sporadičan slučaj
Uput popunio:_____ Kontakt telefon:_____

Napomena: odgovarajući kvadratić obeležiti X . **Za sve potrebne informacije možete kontaktirati Referentnu laboratoriju**

INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE NIŠ
Bulevar dr Zorana Đinđića 50
18 000 Niš, Srbija
Tel. 018/4226-448, 4226-384 Telefax 018/4225-974
www.izjz-nis.org.rs

Referentna laboratorija za kampilobakter i helikobakter
Tel. 018 4226-448, 4226-384 lok. 179
e-mail: mikrobiologija@izjz-nis.org.rs

Uput za slanje seruma za ispitivanje antitela na *Campylobacter jejuni*

Laboratorijski broj RL:

PODACI O POŠILJAOCU

Naziv ustanove_____
Adresa, Opština_____
Telefon ustanove_____
Identifikacioni broj uzorka_____

PODACI O PACIJENTU

Ime: _____Prezime:_____Datum rođenja: ___/___/___
Matični broj_____ br. kartona_____
Pol: ○ m ○ ž
Pacijent: ○ bolnički ○ vanbolnički
Mesto stanovanja: ? grad ? selo
Adresa bolesnika: Opština_____Ulica _____Broj_____
Telefon:_____
Putovanje u inostranstvo u poslednjih 15 dana:
○ Ne ○ Da Odredište: _____

PODACI O UZORKU

Datum uzorkovanja: ___/___/____

Datum slanja u Referentnu laboratoriju: ___/___/_____

KLINIČKI I EPIDEMIOLOŠKI PODACI

Dijagnoza: ?Seronegtivna spondiloartropatija ?Enterokolitis
?Drugo Specifikovati :_____
Simptomatologija:
?Dijareja ?Krvava dijareja ?Povraćanje ?Povišena temperatura ____^{0}C
?Abdominalni bolovi ?Asimptomatski
?Drugo Specifikovati

?Antibiotska terapija: vrsta antibiotika :_____
doza _____trajanje terapije_____(dana)
?Epidemija ?Porodična epidemija ?Sporadičan slučaj
Uput popunio/ordinirajući lekar:_____
Kontakt telefon:_____

Napomena: odgovarajući kvadratić obeležiti X .**Za sve potrebne informacije možete kontaktirati Referentnu laboratoriju**

INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE NIŠ
Bulevar dr Zorana Đinđića 50
18 000 Niš, Srbija
Tel. 018/4226-448, 4226-384 Telefax 018/4225-974
www.izjz-nis.org.rs

Referentna laboratorija za kampilobakter i helikobakter
Tel. 018 4226-448, 4226-384 lok. 179
e-mail: mikrobiologija@izjz-nis.org.rs

Uput za slanje bolesničkog materijala (seruma/stolice) obolelih od GBS, MFS i sličnih oboljenja

Laboratorijski broj RL:

PODACI O POŠILJAOCU

Naziv ustanove_____
Adresa, Opština_____
Telefon ustanove_____
Identifikacioni broj uzorka_____

PODACI O PACIJENTU

Ime: _____Prezime:_____Datum rođenja: ___/___/___
Matični broj_____ br kartona_____
Pol: ○ m ○ ž
Mesto stanovanja: ? grad ? selo
Adresa bolesnika: Opština_____Ulica _____Broj_____
Telefon:_____

Putovanje u inostranstvo u poslednjih 15 dana:
○ Ne ○ Da Odredište: _____

PODACI O UZORKU

Poreklo: ? Stolica Datum uzorkovanja: ___/___/____

? Serum Datum uzorkovanja: ___/___/____

Datum slanja u referentnu laboratoriju: ___/___/____

KLINIČKI I EPIDEMIOLOŠKI PODACI

Datum hospitalizacije**:** ___/___/____
Datum početak neurološkog oboljenja: **:** ___/___/____
Vrsta oboljenja: ? GBS ? MFS ? drugo
(specifikovati)_____

Prethodna dijareja: ? Ne ? Da Datum početka: ___/___/____

Smetnje od strane respiratornog trakta**:** ? Ne ? Da Datum početka: ___/___/____

Ordinirajući lekar/Podatke popunio: _____Kontakt telefon: _____
Napomena: odgovarajući kvadratić obeležiti X .Za sve potrebne informacije možete kontaktirati Referentnu laboratoriju

Campylobacter
Obaveze medicinskih mikrobioloških laboratorija

1. Izolacija i identifikacija *Campylobacter*-a iz stolice, krvi i drugog materijala.
2. Ispitivanje osetljivosti na eritromicin (standardi za *Staphylococcus*) i flourokvinolone disk-difuzionom metodom (ciprofloksacin, standard za *Enterobacteriaceae,* po preporukama CLSI januar 2009 M100-S19 sveska 29).

Campylobacter

Obaveze medicinskih mikrobioloških laboratorija

3. Redovno slanje izolata bakterijskih kultura uz propratni „Uput za slanje bakterijskih kultura *Campylobactera*“ u slučaju:

a. pojave epidemija, kada se šalju se svi epidemijski izolati
b. izolata za koje postoji sumnja da se ne radi ni o *C. jejuni* i *C. coli*

a. izolata kampilobaktera koji ne potiču iz stolice
b. detektovanja sojeva rezistentnih na neki od ispitivanih antibiotika u matičnoj laboratoriji
c. svaka tri meseca se šalje 10 % izolata kampilobaktera radi praćenja osetljivosti

Campylobacter

Obaveze medicinskih mikrobioloških laboratorija

4. Pravovremeno obaveštavanje RL o epidemijskom javljanju kampilobakterioze

5. Mikrobiološke laboratorije u institutima/zavodima za javno zdravlje na teritoriji Srbije treba da preuzmu obavezu sakupljanja i slanja godišnjih izveštaja o primoizolatima kampilobaktera i iz stacionarnih ustanova i iz privatnih laboratorija u nadležnom okrugu.

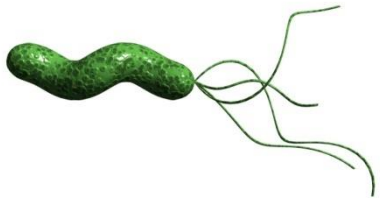
Ove izveštaje treba dostaviti RL najkasnije do 01. 03. sledeće godine

Tabela 1. Teritorijalna rasprostranjenost primoizolata *Campylobacter-a u* Srbiji u 2009. godini

Medicinske mikrobiološke laboratorije u Srbiji	C. jejuni	C. coli	Ukupno
UKUPAN BROJ IZOLATA			
ZJZ Subotica			
OB Zrenjanin			
ZJZ Zrenjanin			
ZC Senta			
ZJZ Kikinda			
ZC Vršac			
ZJZ Pančevo			
ZJZ Sombor			11
IJZ Novi Sad			
DZ Vrbas			
DZ Inđija			
DZ Ruma			
ZJZ S.Mitrovica			
ZC Loznica			
OB Šabac			
ZJZ Šabac			
ZC Valjevo			13
ZJZ Valjevo			
ZC Smederevo			
ZJZ Požarevac			
IJZ Kragujevac			
ZC Aranđelovac			
ZC Jagodina			
ZC Bor			
ZJZ Zaječar			
ZC Užice			
ZJZ Užice			
OB Priboj			
ZJZ Čačak			
ZC G.Milanovac			
ZC Novi Pazar			
ZJZ Kraljevo			
ZC Kruševac			12
ZJZ Kruševac			17
IJZ Niš			57
ZJZ Pirot			2
ZJZ Leskovac			
ZJZ Vranje			
SB Mladenovac			
ZJZ K. Mitrovica			
GZJZ Beograd			858
KC Srbije - Poliklinika			
IZZ majke i deteta Srbije			
Univ. dečija klinika Bgd.			
Kl. za inf. i trop. bol. Bgd.			
KBC Bež. kosa Bg.			
KBC Zvezdara Bgd.			13
KBC "Dr. Mišović" Bgd.			
KBC Zemun			
ZZJZR u žel. saobr. Bgd.			
VMA Beograd			
Zavod "Biomedica" Bgd.			
Zavod "Hexlab" Bgd.			
"Extralab" Bgd.			
"LabMarkovic" Bgd.			
IJZ Srbije "Batut" Bgd.	**53**	37	90

Helicobacter pylori

- *Helicobacter pylori* dovodi do perzistentne inflamacije u želucu ljudi
- Ipak, samo mali broj inficiranih osoba podleže teškim oboljenjima kao što su:
  - peptična ulkusna bolest
  - gastrični MALT limfom
  - želudačni adenokarcinom



Helicobacter pylori

- Brojne studije su pokazale fenotipsku i genotipsku raznovrsnost izolata *H. pylori*, što dovodi do različitih inflamatornih odgovora domaćina i različitog kliničkog ishoda
- Poznavanjem mehanizama infekcije *H. pylori* moguće je odrediti povećani rizik za razvoj bolesti kod *H. pylori* kolonizovanih osoba

Helicobacter pylori

- Danas postoje različiti testovi za dokazivanje infekcija izazvanih *H. pylori*.
- Prednost se daje razvoju i usavršavanju neinvazivnih tehnika
- Invazivni testovi su prvi primenjeni za otkrivanje infekcije *H. pylori*
- “Zlatni standard”

Helicobacter pylori

- S obzirom da rizik za nastanak oboljenja zavisi od specifične interakcije između patogena i domaćina, poznavanje patogenih mehanizama *H. pylori* pomaže pri određivanju povećanog rizika za razvoj bolesti kod osoba kolonizovanih *H. pylori* i olakšava lekarima primenu najadekvatnijeg dijagnostičkog testa i primenu eradikacione terapije.

Helicobacter pylori

- Kod bolesnika kod kojih je urađena endoskopija, radi prikupljanja biopsijskih uzoraka želuca, dokazivanje infekcije *H. pylori* postiže se primenom histoloških i kultivacijskih metoda i brzim ureaza testovima
- Kultivisanje bakterija je veoma specifična (100%) metoda za utvrđivanje infekcije *H. pylori*, ali je njena senzitivnost značajno manja u poređenju sa drugim metodama
- Histološke metode su najsenzitivnije dijagnostičke metode u identifikaciji *H. pylori* u bioptatima želuca

Babić T, et al. Vojnosanit Pregl 2005; 62(1): 39–43.

UDC:579.835.12:616·

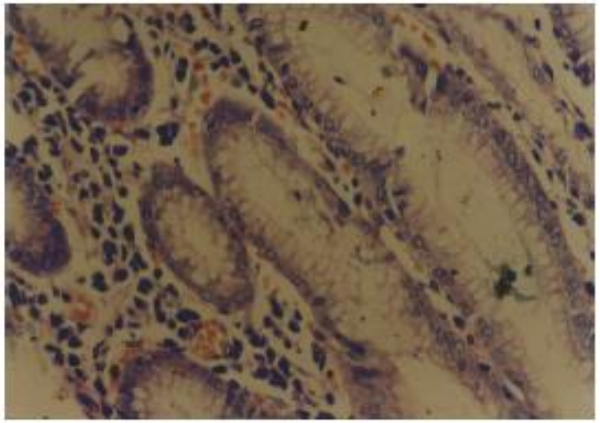
Otkrivanje *Helicobactera pylori* u uzorcima dobijenim biopsijom i resekcijom želuca

Tatjana Babić*, Hakija Bašić†, Biljana Miljković Selimović‡, Branislava Kocić‡, Gordana Tasić‡

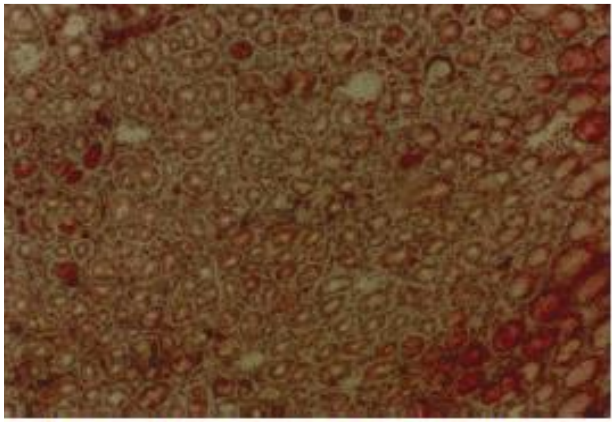
Institut za zaštitu zdravlja, *Sektor za mikrobiologiju, **Niš**; **Medicinski fakultet**, †Institut za patologiju, ‡Institut za mikrobiologiju i imunologiju, **Niš**

Helicobacter pylori

- Imunohistohemijska metoda u kojoj se koriste specifična antitela je veoma osetljiva metoda identifikacije *H. pylori* u uzorcima dobijenim biopsijom i resekcijom želuca
- Ona je osetljivija od tradicionalnih histoloških metoda bojenja (modifikovana metoda po Giemsa-i)

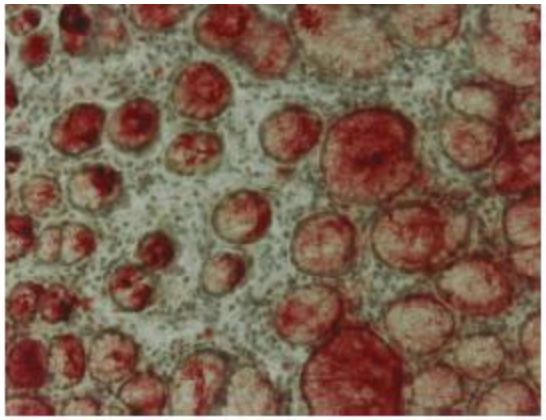


Sl. 1 – Spiralne forme *H. pylori* u blizini površine lumena epitelnih ćelija koje oblažu superficijalne foveole. (Modifikovana Giemsa boja × 400).



Sl. 3 – Reakcioni depoziti (na slici crno) ukazuju na pozitivan nalaz za *H. pylori* (APAAP × 400).

Helicobacter pylori



Sl. 2 – Vide se reakcioni depoziti (na slici crno) preko čitave površine epitela foveola želuca i unutar mucinoznog sekreta, kao izraz pozitivnog nalaza za *H. pylori*. Imunohistohemijska metoda sa poliklonskim antitelom protiv *H. pylori* (APAAP × 400).

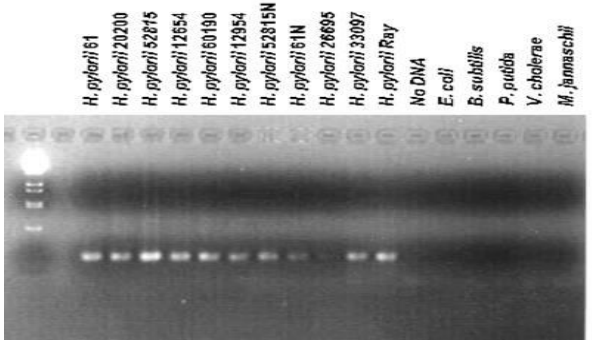
Ovu metodu bio trebalo obavezno primeniti:

- Kada postoji histološki nalaz hroničnog gastritisa kod kojih modifikovanom Giemsa - metodom nije dokazano prisustvo *H. pylori*
- Za potvrdu eradikacije *H. pylori* kod bolesnika sa MALT limfomom
- Na uzorke kod kojih se, primenom histoloških metoda, kokoidni oblici *H. pylori* ili bakterije slične morfologije ne mogu pouzdano identifikovati kao *H. pylori*

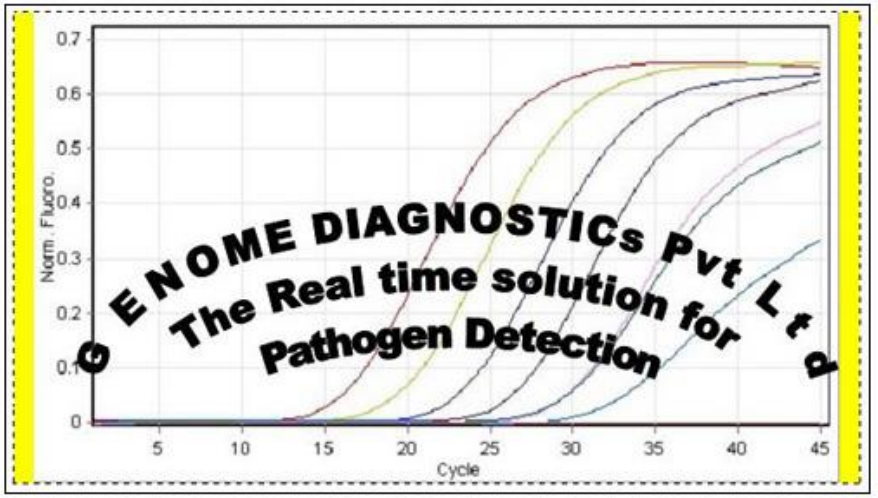
Helicobacter pylori

Molekularne metode detekcije

- Da bi se direktno dokazali
  - faktori virulencije *H. pylori*,
  - kao i osetljivost na makrolide



- razvijene su molekularne metode („realtime” PCR)



Helicobacter pylori

Detekcija *H. pylori* primenom tehnike "real-time PCR FRET"

Uzorkovanje biopsija

1 sat ⇩ Obrada biopsije, liza bakterija i ekstrakcija DNK

DNK

45 minuta ⇩ PCR (LightCycler®)

Identifikacija i otkrivanje tačkaste mutacije

Trajanje protokola: 2 sata

Helicobacter pylori

Uputstvo za transport, izolovanje i čuvanje kultura

- Kultivacija *H. pylori* je veoma pouzdana metoda koja omogućuje i testiranje antibiotske osetljivosti
- Ipak, kultivacija *H. pylori* je zahtevna naročito kod pacijenata koji su predhodno uzimali antibiotike, antagoniste H_2 receptora ili inhibitore protonske pumpe
- Uspešnost kultivisanja *H. pylori* u najvećoj meri zavisi od broja uzetih biopsijskih uzoraka kao i od uslova
- Za mikrobiološko ispitivanje potrebno je uzeti najmanje dva uzorka antruma želuca: jedan za mikroskopski pregled a drugi za kultivaciju
- Međutim, kod pacijenata koji su primali inhibitore protonske pumpe, bar jedan uzorak bioptata treba uzeti iz korpusa želuca.
- Sve uzorke treba čuvati na 4˚C pre i nakon transporta u laboratoriju

Helicobacter pylori
Transport bioptata

- Ukoliko se uzorak transportuje u laboratoriju unutar jednog sata onda je moguće koristiti 0.9% NaCl (po 0,5 ml tečnosti)
- Kod dužeg transporta primenjuje se Brucella bujon

  Pravi se po preporuci proizvođača sa dodatkom 0,5% goveđeg serumskog albumina
- Potrebno je po tri mililitra ove transportne podloge staviti u epruvete sa zatvaračem

Helicobacter pylori

Alternativne transportne podloge

- 20% rastvor glukoze
- Polučvrsta Stuart-ova transpotrna podloga

  U ovoj podlozi *H. pylori* preživljava 6h na temperaturi do 15˚C, ili 48h ako se čuva na 4˚C.
- MSI sa 20% glicerola

Helicobacter pylori

Kultivacija na čvrstim podlogama

- Inokulacija *H. pylori* vrši se na jednu selektivnu podlogu sa dodatkom antibiotika i jednu neselektivnu podlogu bez dodatka antibiotika (na primer, moždano srčani infuzioni agar)
- Za izolaciju *H. pylori* preporučuje se korišćenje sveže pripremljenih, vlažnih podloga (moguće je sveže pripremljene podloge staviti u plastičnu kesu, zavezati i čuvati na 4˚C i tako koristiti unutar dve nedelje)
- U svaku podlogu dodaje se puna krv ili krv lizirana saponinima (7%) koju je potrebno dobro izmešati sa tečnim agarom da bi se dobila ravnomerna distribucija

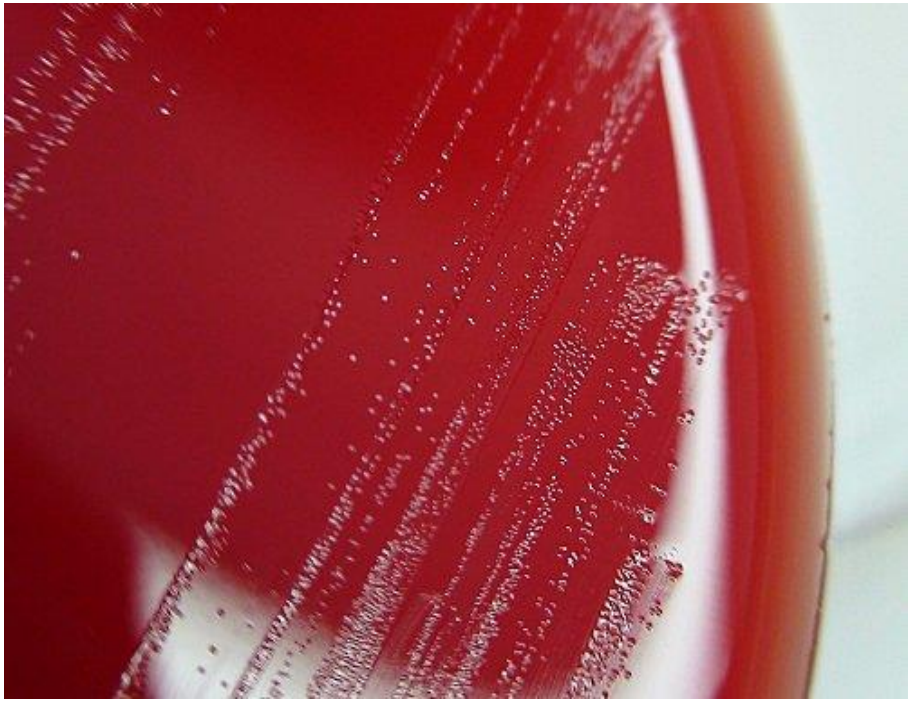
Helicobacter pylori
Baze za krvni agar

- Moždano srčani infuzioni (Brain Heart infusion-BHI) agar
- Columbia blood agar sa Dents-ovim selektivnim suplementom za *H. pylori*
- Brucella agar
- Columbia agar
- Komercijalne gotove podloge

Helicobacter pylori

Antibiotski suplement za selektivnu hranljivu podlogu

- 10 mg/l vancomicin
- 10 mg/l amfotericin
- 5 mg/l cefsulodin
- 5 mg/l trimetropim



Helicobacter pylori

Atmosfera i temperatura inkubacije

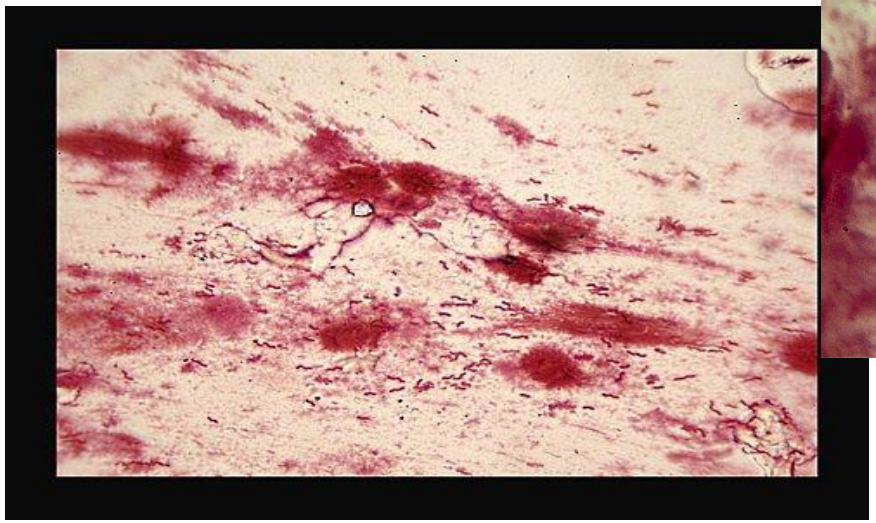
- 5-7% O_2, 5-10% CO_2
- Odgovarajuća atmosfera postiže se primenom gas produkujućih kitova za kampilobakter
- Vlažna atmosfera u loncu za kultivaciju postiže se stavljanjem vlažnog filter papira ili vlažne vate na dno lonca
- Posle svake upotrebe očistiti lonce dezinfekcionim srestvom
- Temperatura inkubacije treba biti 37˚C

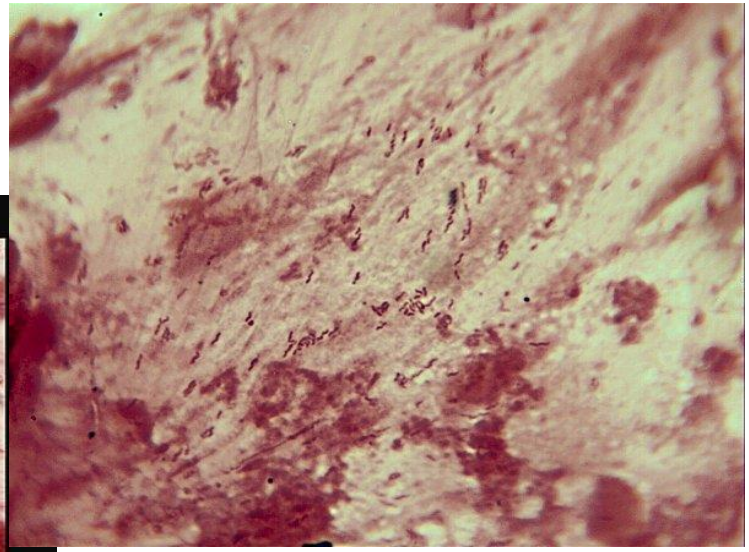
Helicobacter pylori
Pravljenje mikroskopskih preparata

- Uzeti uzorak bioptata iz transportne podloge sterilnom pincetom
- Uzorak koji služi za mikroskopiranje ne treba gnječiti
- Iseći mali ugao biopsije za mikroskopiranje i razmazati preko predmetnog stakla
- Ukoliko su dva uzorka poslata za mikrobiološku obradu, onda mali deo oba treba razmazati po pločici

Helicobacter pylori
Bojenje po Gram-u

- Primenjuje se standardno bojenje po Gram-u
- Oblici *H. pylori*
  - kratki štapići
  - zakrivljeni štapići
  - spirale oblika slova S





Helicobacter pylori
Kultivacija

- **Priprema inokuluma i inokulacija na agar ploče**
- Uzeti bioptat iz transportnog medijuma pomoću sterilne pincete
- Zasejavanje bioptata vrši se na jednu selektivnu i jednu neselektivnu podlogu
- Uzorak zasejati po celoj površini ploče, bilo pomoću žičane omčaste eze, sterilnog staklenog štapića sa zakrivljenim krajem ili Pasteur-ove pipete sa zakrivljenim krajem
- U lonac staviti kit za stvaranje gasa prema upustvu proizvodjača

Helicobacter pylori

Inkubacija i održavanje mikroaerobne atmosfere

- Održavanje odgovarajuće atmosfere,se postiže menjanjem kesica na svaka dva dana ili prilikom svakog otvaranja lonca
- Za primarnu izolaciju neophodno je inkubirati ploče na 37˚C do 7 dana
- Međutim, ukoliko se kultivacijom potvrdjuje uspešnost primenjene terapije, onda je neophodno ploče inkubirati 10 dana
- Ploče se pregledaju prvi put nakon dva ili tri dana, a onda svakodnevno
- Izolati *H. pylori* ne smeju biti ostavljeni na vazduhu duže od 45 minuta

Helicobacter pylori

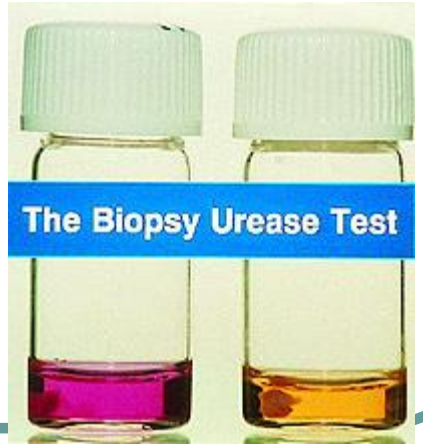
Identifikacija

- Kolonije *H. pylori* su male (2mm) i prozračne
- Bojenje po Gram-u pokazuje Gram- negativne savijene bacile

Helicobacter pylori

Identifikacija

- Testovi oksidaze, katalaze i ureaze su pozitivni
- Ureazna aktivnost *H. pylori* detektuje se inokulacijom pune eze kulture u 0,25ml urea bujona i inkubacijom na 37˚C u vodenom kupatilu
- Pojava crvene boje unutar nekoliko minuta označava pozitivnu reakciju



Helicobacter pylori

Subkultivacija *H. pylori*

- Subkultivacija pojedinačnih kolonija *H. pylori* je zahtevna procedura, a postiže se ukoliko se jedna kolonija subkultiviše na polje u prečniku od samo jednog cm
- Nakon inkubacije od 2-3 dana, porast treba razvući preko većeg dela podloge

Helicobacter pylori
Čuvanje izolata

- **Liofilizacija**
  - Sveži izolat (2-3dana)
- **U tečnom azotu**
  - BHI bujon sa 20% glicerolom sačuvaće kulture duže od 6 meseci.
- **Na -70˚C**
  - BHI bujon sa 10% glicerolom . *H. pylori* ostaje živ nekoliko meseci
  - 1ml 1% peptonske vode i 25% glicerol se inokuliše svežom kulturom *H. pylori* - najmanje jedna godina
- **Na polučvrstoj podlozi na 37˚C**
  - 0,17% BHI agar sa dodatkom 10% konjskog seruma i 0,25% ekstrakta kvasca inokulira se sveže poraslim kolonijama *H. pylori*.
  - Ova polučvrsta podloga ostavi se u CO_2 inkubator na 37˚C sa 98% vlažnošću. Kulture se subkultivišu mesečno na istu podlogu.
  - Vlažnost treba održavati na 95%-98%; S obzirom da ova vlažnost pogoduje razvoju gljivica, inkubator se mora redovno čistiti antifungalnim sredstvima.

Helicobacter pylori

Testovi osetljivosti "in vitro"

- Kontrola kvaliteta obavlja se s referentnim sojem *H pylori* ATCC 43504
  - Ispitivanje osetljivosti vrši
    - disk difuzionim metodom
    - E – testom

  - Testiranje se može

    vršiti na sledeće antibiotike: metronidazol, levofloksacin, tetraciklin, klaritromicin, amoksicilin i rifabutin

Helicobacter pylori

Aktivnosti refrentne laboratorije

1. Kultivisanje helikobaktera iz bioptata želuca
2. Biohemijska identifikacija izolata helikobaktera
3. Serološka dijagnostika infekcije helikobakterom
4. Održavanje zbirke kulture (referentne, domaćekulture) helikobaktera
5. Ispitivanje osetljivosti kultura helikobaktera
6. Transport uzoraka u supranacionalnu laboratoriju

Helicobacter pylori

Aktivnosti refrentne laboratorije

7. Prikupljanje anamnestičkih i epidemioloških podataka
8. Uspostavljanje laboratorijske baze podataka
9. Izrada i distribucija godišnjeg izveštaja o teritorijalnoj rasprostranjenosti primoizolata *Helicobacter-a pylori*
10. Uvođenje novih metoda – molekularna identifikacija PCR, Real – Time PCR i tipizacija PFGE epidemijskih sojeva
11. Stručna mišljenja, vodiči, predavanja:
    - Obuka lekara
    - Prezentacija izveštaja i stručnih uputstava
    - Pružanje stručnih saveta i konsultacije

Helicobacter pylori

Aktivnosti refrentne laboratorije

- RL sarađuje sa državnim i privatnim mikrobiološkim laboratorijama
- u institutima/zavodima za javno zdravlje
- u bolničkim
- i u veterinarskim ustanovama na teritoriji Republike Srbije

INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE NIŠ
Bulevar dr Zorana Đinđića 50
18 000 Niš, Srbija
Tel. 018/4226-448, 4226-384 Telefax 018/4225-974
www.izjz-nis.org.rs

Referentna laboratorija za kampilobakter i helikobakter
Tel. 018 4226-448, 4226-384 lok. 179
e-mail: mikrobiologija@izjz-nis.org.rs

Uput za slanje bakterijskih kultura *Helicobacter pylori*

Laboratorijski broj RL:

PODACI O POŠILJAOCU

Laboratorija_____
Ustanova_____
Adresa, Opština_____
Telefon ustanove_____
Identifikacioni broj uzorka_____

PODACI O PACIJENTU

Ime: _____Prezime:_____Datum rođenja: ___/___/___
Matični broj_____ br kartona_____
Pol: ○ m ○ ž
Pacijent: ○ bolnički ○ vanbolnički
Telefon:_____

PODACI O UZORKU

Laboratorijski broj uzorka_____
Datum izolacije ___/___/____**Datum slanja u Referentnu laboratoriju**___/___/_____
Poreklo izolata ○korpus ○angulus ○antrum
Preliminarna biohemijska identifikacija ○ Ne ○ Da: specificirati_____
Endoskopski nalaz:
○uredan ○ antralna hiperemija ○ ulkus duodenuma ○ ulkus želuca
○drugo: specificirati_____
pozitivan ureaza test ○ Da ○ Ne

KLINIČKI I EPIDEMIOLOŠKI PODACI

○Rutinsko ispitivanje ○Stomačne tegobe ○ kontrola
○drugo: specificirati_____
porodična anamneza ○Ne ○Da: specificirati_____

Simptomi: ○ bol u abdomenu ○ epigastrični bol
○ periumbilikalni abdominalni bol ○ nelokalizovani abdominalni bol
○ povraćanje ○ nauzea ○ halitus ○ gorušica ○ nadimanje trbuha
○ drugo: specificirati_____
Trajanje simptoma (meseci):_____
Primena antibiotika u poslednje 4 nedelje
○ Ne ○ Da: specifikovati_____
Primena antacida u poslednje 2 nedelje
○Ne ○ Da: specifikovati_____
Postojanje drugog oboljenja digestivnog trakta i jetre
○ Ne ○Da: specifikovati_____

Uput popunio: _____ **datum:** ___/___/_____
Napomena: odgovarajući kvadratić obeležiti X
Za sve potrebne informacije možete kontaktirati Referentnu laboratoriju

INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE NIŠ
Bulevar dr Zorana Đinđića 50
18 000 Niš, Srbija
Tel. 018/4226-448, 4226-384 Telefax 018/4225-974
www.izjz-nis.org.rs

Referentna laboratorija za kampilobakter i helikobakter
Tel. 018 4226-448, 4226-384 lok. 179
e-mail: mikrobiologija@izjz-nis.org.rs

Uput za slanje seruma za ispitivanje antitela na *H. pylori*

Laboratorijski broj RL:

PODACI O POŠILJAOCU

Naziv ustanove_____
Adresa, Opština_____
Telefon ustanove_____
Identifikacioni broj uzorka_____

PODACI O PACIJENTU

Ime: _____Prezime:_____Datum rođenja: ___/___/___
Matični broj_____ br kartona_____
Pol: ○ m ○ ž
Pacijent: ○ bolnički ○ vanbolnički
Telefon:_____

PODACI O UZORKU

Datum uzorkovanja ___/___/____
Datum slanja u Referentnu aboratoriju___/___/_____
Endoskopski nalaz:
○ uredan ○ antralna hiperemija ○ ulkus duodenuma ○ ulkus želuca
○ drugo: specificirati_____
pozitivan ureaza test ○ Da ○ Ne

KLINIČKI I EPIDEMIOLOŠKI PODACI

○ Rutinsko ispitivanje ○ Stomačne tegobe ○ kontrola
○ drugo: specificirati_____
porodična anamneza ○ Ne ○ Da: specificirati_____

Simptomi: ○ bol u abdomenu ○ epigastrični bol
○ periumbilikalni abdominalni bol ○ nelokalizovani abdominalni bol
○ povraćanje ○ nauzea ○ halitus ○ gorušica ○ nadimanje trbuha
○ drugo: specificirati_____
Trajanje simptoma (meseci):_____
Primena antibiotika u poslednje 4 nedelje
○ Ne ○ Da: specifikovati_____
Primena antacida u poslednje 2 nedelje
○ Ne ○ Da: specifikovati_____
Postojanje drugog oboljenja digestivnog trakta i jetre
○ Ne ○ Da: specifikovati_____

Uput popunio: _____ **datum:** ___/___/_____
Napomena: odgovarajući kvadratić obeležiti X
Za sve potrebne informacije možete kontaktirati Referentnu laboratoriju

INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE NIŠ
Bulevar dr Zorana Đinđića 50
18 000 Niš, Srbija
Tel. 018/4226-448, 4226-384 Telefax 018/4225-974
www.izjz-nis.org.rs

Referentna laboratorija za kampilobakter i helikobakter
Tel. 018 4226-448, 4226-384 lok. 179
e-mail: mikrobiologija@izjz-nis.org.rs

Uput za slanje bioptata želuca za izolovanje *H. pylori*

Laboratorijski broj RL:

PODACI O POŠILJAOCU

Naziv ustanove_____
Adresa, Opština_____
Telefon ustanove_____
Identifikacioni broj uzorka_____

PODACI O PACIJENTU

Ime: _____Prezime:_____Datum rođenja: ___/___/___
Matični broj_____ br kartona_____
Pol: ○ m ○ ž
Pacijent: ○ bolnički ○ vanbolnički
Telefon:_____

PODACI O UZORKU

Datum uzorkovanja ___/___/____
Datum slanja u Referentnu laboratoriju___/___/_____
Poreklo bioptata ○korpus ○angulus ○antrum
Endoskopski nalaz:
○uredan ○ antralna hiperemija ○ ulkus duodenuma ○ ulkus želuca
○drugo: specificirati_____
pozitivan ureaza test ○Da ○Ne

KLINIČKI I EPIDEMIOLOŠKI PODACI

○Rutinsko ispitivanje ○Stomačne tegobe ○ kontrola
○drugo: specificirati_____
porodična anamneza ○Ne ○Da: specificirati_____

Simptomi: ○ bol u abdomenu ○ epigastrični bol
○ periumbilikalni abdominalni bol ○ nelokalizovani abdominalni bol
○ povraćanje ○ nauzea ○ halitus ○ gorušica ○ nadimanje trbuha
○ drugo: specificirati_____
Trajanje simptoma (meseci):_____
Primena antibiotika u poslednje 4 nedelje
○ Ne ○ Da: specifikovati_____
Primena antacida u poslednje 2 nedelje
○Ne ○ Da: specifikovati_____
Postojanje drugog oboljenja digestivnog trakta i jetre
○ Ne ○Da: specifikovati_____

Uput popunio: _____ **datum:** ___/___/_____
Napomena: odgovarajući kvadratić obeležiti X
Za sve potrebne informacije možete kontaktirati Referentnu laboratoriju

Helicobacter pylori

Aktivnosti medicinskih mikrobioloških laboratorija

1. Izolacija i identifikacija *Helicobactera*
2. Slanje izveštaja o izolovanim sojevima
3. Slanje izveštaja o serološki dijagnostikovanoj infekciji *Helicobacter*-om
4. Slanje seruma za serološku dijagnostiku *Helicobacter-a pylori* po potrebi uz propratni „Uput za slanje seruma za dokazivanje antitela na *Helicobacter pylori*“
5. Slanje izolata u RL za potvrdu uz propratni „Uput za slanje bakterijskih kultura *Helicobacter*-a“
6. Slanje izolata u RL za ispitivanje osetljivosti „Uput za slanje bakterijskih kultura *Helicobacter-a*“

Tabela 2. Teritorijalna rasprostranjenost *Helicobacter* -a u Srbiji u 2009. godini

Medicinske mikrobiološke laboratorije u Srbiji	IgA	IgG	IgA+IgG	Ukupno
Ukupan broj izolata				
ZJZ Subotica				254
OB Zrenjanin				
ZJZ Zrenjanin				
ZC Senta				
ZJZ Kikinda				
ZC Vršac				
ZJZ Pančevo		331		331
ZJZ Sombor		254		254
IJZ Novi Sad				
DZ Vrbas				
DZ Inđija				
DZ Ruma				
ZJZ S.Mitrovica				
ZC Loznica				
OB Šabac				
ZJZ Šabac				
ZC Valjevo		427		427
ZJZ Valjevo				
ZC Smederevo				
ZJZ Požarevac				
IJZ Kragujevac				
ZC Aranđelovac				
ZC Jagodina				
ZC Bor				
ZJZ Zaječar				
OB Užice				
ZJZ Užice				
OB Priboj				
ZJZ Čačak				
ZC G.Milanovac				
ZC Novi Pazar				
ZJZ Kraljevo				
ZC Kruševac				
ZJZ Kruševac				
IJZ Niš	**6**	12	20	38
ZJZ Pirot				
ZJZ Leskovac	**175**	337		337
ZJZ Vranje				
SB Mladenovac				
ZJZ K. Mitrovica				
GZJZ Beograd				
KC Srbije Poliklinika				
IZZ majke i deteta Srbije				
Univ. dečija klinika Bgd.				
Kl. za inf. i trop. bol. Bgd.				
KBC Bež. kosa Bg.				
KBC Zvezdara Bgd.				
KBC "Dr. Mišović" Bgd.				
KBC Zemun				
ZZJZR u žel. saobr. Bgd.				
VMA Beograd				
Zavod "Biomedica" Bgd.				
Zavod "Biomedica" Bgd.				
Zavod "Hexlab" Bgd.				
"Extralab" Bgd.				
"LabMarkovic" Bgd.				
IJZ Srbije "Batut" Bgd.				
Human Niš	**3**	11	**4**	**18**
Neolab Niš				

Референтна лабораторија за кампилобактер и хеликобактер
Tel. 018 4226-448, 4226-384 lok. 179
e-mail: mikrobiologija@izjz-nis.org.rs

Територијална распрострањеност примоизолата*Campylobacter*-а и *Helicobacter*-а у Србији у 2009. години - извештај

Campylobacter spp.

Дописи

Упутство

Упути за слање

Helicobacter pylori

Дописи

Упутство

Упути за слање

Sajt : www. izjz-nis.org.rs

Nadam se da ćemo uspešno sarađivati!!!