Стандардни оперативни поступак (СОП)
Идентификовање термотолерантних сојева у роду *Campylobacter*

Издање јун 2025

Приредила Проф. Др Биљана Миљковић Селимовић
Институт за јавно здравље Ниш,
Центар за микробиологију, Ниш, Србија
Референтна лабораторија за *Campylobacter* и *Helicobacter*

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Увод и сврха

Сврха овог документа је стандардизација биохемијских тестова за идентификацију кампилобактера. Као такав, овај документ није обавезујући. Следећи поступци су неопходни да би се *Campylobacter* доказао биохемијским идентификовањем.

***Род Campylobacter се идентификује на основу следећих особина*:**

- Танки савијени штапићи, хеликоидног или закривљеног изгледа, Грам-негативни
- Веома покретни деловањем једне поларне флагеле
- Оптимална концентрација кисеоника за раст: 5–10%
- Не ферментује нити оксидише шећере
- Не продукује индол (обратити пажњу на разлику у односу на хидролизу индоксил ацетата)

Према ISO 10272 (Микробиологија хране и хране за животиње – Хоризонтална метода за детекцију термотолерантних *Campylobacter*) *Campylobacter* се идентификује следећим карактеристикама:

- морфологија и покретљивост
- морфологија на бојењу по Граму
- тест оксидазе
- тест глукозе
- тест лактозе
- тест сахарозе
- продуковање гаса

Стога се идентификаовање и диферентовање (одређивање специјеса) сојева врши на основу:

- морфологије и покретљивости
- морфологије на бојењу по Граму
- тестом каталазе
- тестом оксидазе
- тестом хидролизе хипурата
- тестом хидролизе индоксил ацетата

Campylobacter као узрочник тровања храном

Тровање храном изазвано бактеријама из рода *Campylobacter* углавном погађа појединачне особе. Епидемије изазване овим бактеријама су ретке. Чешће су описиване епидемије услед употребе контаминираног млека и воде, него хране. Зато су честе мале кућне епидемије. *Campylobacter jejuni* је најчешће изолован код хуманог бактеријског ентеритиса. *Campylobacter coli*, такође, може бити изолован.

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Идентификовање термотолерантних *Campylobactera* из столице

Материјал

Опрема

- Еза за инокулисање (1 μL и 10 μL)
- Инкубатор (37°C / 42°C)
- Микроскоп
- Предметна стакла
- Покровна стакалца
- Уље за имерзију
- Папирни дискови 6 мм
- Пипете од 0,2 мл (нпр. пипета од 1 мл)
- бочица од 200 мл
- Пинцета
- Еппендорф епрувете од 1,5 мл
- Бројач капи

Подлоге

- Стерилна вода
- 3% H_2O_2
- 1% раствор хипурата
- 3,5% раствора нинхидрина
- 10% раствор индоксил ацетата
- Тест оксидазе
- Реагенси за бојење по Грам-у
- Кристал виолет
- Грамов раствор јода
- Етанол (95%)
- Карбол фуксин

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Контролни бактеријски сојеви:

Campylobacter lari ATCC 35221 (негативна хидролиза индоксил ацетата)
Campylobacter coli ATCC 33559 (негативна хидролиза хипурата)
Campylobacter jejuni ATCC 700819 (позитивна хидролиза хипурата)
Pseudomonas aeruginasa ATCC 27853 (позитиван тест оксидазе)
Enterococcus faecalis ATCC 29212 (негативан тест каталазе)
Staphylococcus aureus ATCC 29213 (негативан тест оксидазе)

Сигурност

Све поступке треба спроводити у складу са локалном праксом сигурности извођења реакција.

Идентификовање

Микроскопија (морфологија и покретљивост)

Једна кап стерилног физиолошког раствора се ставља на предметно стакло. Колоније са плоче mCCD агара се промешају са ФР. Стави се покровна љуспица преко суспензије и стави се стакло на микроскоп. Основна карактеристика термофилних бактерија овог рода је њихов спирални или савијен облик. Дуге спиралне форме површно личе на спирохете. Међутим, кампилобктери имају флагелу, обично, једну на једном или оба пола, веома су покретљиви, окрећу се око уздужне осовине.

Бојење по Граму (морфологија, слика 1)

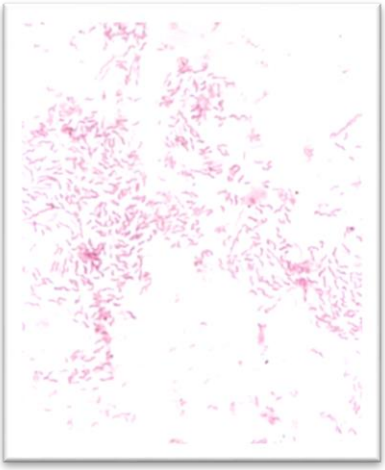
Једна кап стерилног физиолошког раствора се ставља на предметно стакло. Колоније са плоче mCCD агара се промешају са физиолошким раствором (ФР) и развуку по површини стакла. Размаз се добро осуши. Размаз се фиксира провлачењем кроз пламен Бунзенове лампе три пута. После хлађења размаз може бити обојен. После сваког стављања реагенаса, размаз се нежно испира под млазом текуће воде. Вишак воде се уклања пре додавања следећег реагенаса.

1. Кристал виолет (60 sec)
2. Грамов јод (60 sec)
3. Етанол (деколоризаовање) (60 sec)
4. Карбол фуксин (60 sec)

.

Грам негативна бактерија (као *Campylobacter*) се деколорише и боји црвено супротном бојом (карбол фуксином).
Campylobacter је савијен или је облика галебових крила. Старе културе могу да садрже кокоидне форме бактерија.

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије



Слика 1

Идентификовање

Тест каталазе

Ставити колонију на малу тачку на предметном стаклу (НЕ правити суспензију; само осушити). Ставити једну кап 3%- H_2O_2 на место на које је стављена култура. Одмах утврдити да ли је створен гас (појава мехурића), што указује на активност каталазе.

Ензим каталаза цепа водоник пероксид: $H_2O_2 + H_2O_2 => O_2 + 2H_2O$. Пероксидаза једино може да редукује H_2O_2 ако је присутан органски супстрат и у исто време служи као донор водоника.

Тест оксидазе

Пренети једну колонију на филтер папир. Натопити филтер папир у раствор оксидазе. Појава плаве боје унутар 10 сек. указује на позитиван резултат.
Метод је заснован на принципу да неки фенол-диамин-деривативи оксидишу цитохром Ц да би се добио плавичасти индофенол. Доступни су и комерцијални китови.

Хидролиза хипурата

Суспендовати езу културе старе 18-24 часова на плочу Columbia агара која садржи 5% телеће крви у 400 µL 1%-раствора хипурата (водити рачуна да се не стави и агар!). Инкубирати на 37°C два сата. Онда полако додати 200 µL 1% раствора хипурата свежег или чуваног на -20 °C током 6 месеци.
Хидролизом се хипурат разлаже на бензоичну киселину.
Додати 3,5%-раствор нинхидрина низ зид епрувете да би се добио слој који покрива. 3,5%-раствор нинхидрина: стабилана око 6 месеци.
Реинкубирати током 37°C за 10 мин, и очитати реакцију. Позитивн реакција: тамно љубичасто/плаво. Негативна реакција: бистро или сиво.

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Идентификовање термотолерантних сојева у роду *Campylobacter*

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Хидролиза индоксил ацетата

Додати 50 µL 10% (w/в) раствора индоксил ацетата у ацетону на диск адсорбентног папира пречника 6 мм и допустити да се осуши на ваздуху. Нанети пораст са једне колоније *Campylobacter* директно на диск и наквасити са капи стерилне дестиловане воде. Појава плаво зелене боје унутар 5-10 минута указује на позитиван резултат.
Бактеријски ензим естераза отпушта индоксил из индоксил ацетата који спонтано формира индиго у присуству кисеоника.
Суви дискови су стабилни барем 12 месеци ако се чувају на 4°C у боцама са тамним стаклом са силика гелом. Дискове не треба употребљавати ако се боја промени из беле или ако прође рок за употребу.

Састав и припремање медијума за култивисање као и реагенаса

Подлоге и реагенси су доступни преко компанија као сто су Oxoid, Merck, Difco и друге. Састав дехидрисаних подлога дат је у даљем тексту и може да варира мало у зависности од произвођача. Подлоге треба буду направљене према упутству произвођача, ако се опис разликује од оног који је дат на овом месту.

Физиолошки раствор

Натријум хлорид 8.5 г
Вода 1000 mL

Припрема:

Растворити натријум хлорид у води, ако је потребно загревањем. Дотерати pH ~ 7.0 после стерилизације. Разлити раствор у епрувете тако да се добије 4 mL после аутоклавирања на 121ºЦ током 20 мин.

3,5 % Раствор нинхидрина

Нинхидрин ($C_9H_6O_4$) 3,5 g
Ацетон (C_3H_6O) 50 mL
Бутанол ($C_4H_{10}O$) 50 mL
Растворити хемикалију у растварачу. Чувати на + 5°C у тамној боци од 20 мл.

1% Раствор хипурата

Натриумхипурат ($C_9H_8NNaO_3$) 1 g
PBS 99 mL

Растворити хемикалију у растворачу. Чувати на -20°C у епруветама од 15 мл.

Бојење по Грам-у

Кристал виолет

Кристал виолет 2.0г
Етанол 95% (вол/вол) 20.0 mL

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Амониум оксалат 0.8 g
Дестилована вода 80,0 mL

Кристал виолет се најпре раствори у етанолу, онда се амониум оксалат раствори у дестилованој води. Споје се два раствора. Да би се убрзао процес растварања, обе мешавине се ставе у купатило са врућом водом и помешају се.

Грамов луголов раствор

Кристали јода 1,0 г
Калијум јодид 2,0 г
Дестилована вода 200 mL

Кристали јода и калијум јодида се стуцају заједно и полако се дода дестилована вода. Ако је неопходно, мешавина може да се агитира у воденом купатилу са врућом водом да би се убрзало растварање.

Одбојивач

Етанол 95% (вол/вол)

Карболфуксин (супротна боја)

Концентровани карбол фуксин 10,0 mL

Дестилована вода 90,0 mL

10% Раствор индоксилацетата

Индоксилацетат ($C_{10}H_9HO_2$) 10 г

Ацетон (C_3H_6O) 90 mL

Растворити хемикалију у ацетону. Чувати на +4ºЦ у тамној боци.

Раствор оксидазе

Л(+)-Аскорбинска киселина 0,03 г
N,N,N´,N´- Tetrametil-p-fenildiamin
Дихидрохлорид ($C_{10}H_{16}N_2 \bullet 2HCl$) 0,03 г
Стерилна вода 30 mL
Растворити хемикалије у води, чувати раствор у тамној боци на +5°C током три недеље.

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Додатак 1: Лист за бележење резултата

ATCC 29212 ***E. faecalis***					
ATCC 35221 ***C.lari***					
ATCC 33559 ***C.coli***					
ATCC 700819 ***C.jejuni***					
QC-Strain	**Бојење по Граму**	**Тест каталазе**	**Тест оксидазе**	**Хидролиза хипурата**	**Хидролиза индоксил ацетата**

E. faecalis
C.lari
C.coli
C.jejuni

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Лист за белешке: Идентификовање *Campylobacter*-а.

Датум:_____Потпис.:_____

Биохемијски тестови

	Соj #	**Соj #**	**Соj #**	**Соj #**	**Соj #**	**Соj #**
Морфологија ћелија (микроскопски)						
Покретљивост (микроскопски)						
Бојење по Граму						
Тест каталазе						
Тест оксидазе						
Хидролиза хипурата						
Хидролиза индоксил ацетата						
Специјес:						

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Додатак 2

Фотографије ракција и тестова код *Campylobacter*-а.

Идентификовање сојева

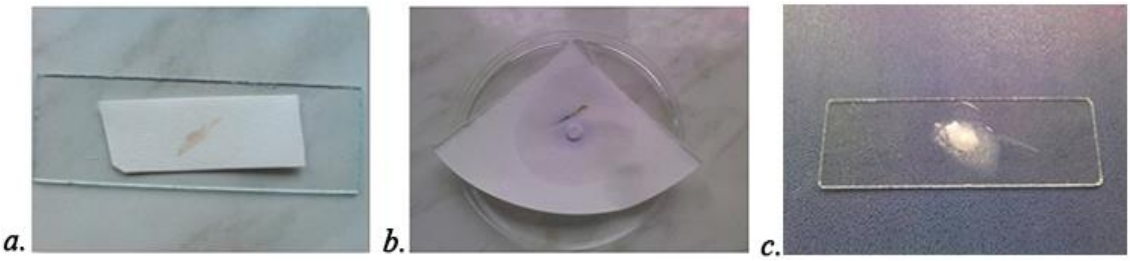
Табела 1. Биохемијске особине најчешћих бактерија из рода *Campylobacter*

Микроорганизам	**Каталаза**	**Оксидаза**	**Хидролиза хипурата**	**Хидролиза индоксил ацтетата**	**Осетљивост на цефалотин**
C. jejuni	+	+	+	+	P
C. coli	+	+	-	+	P
C. lari	+	+	-	-	P
C. fetus	+	+	-	-	C

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Најчешће коришћени тестови су: хидролиза хипутрата (слика 2) и индоксил ацетата (слика 3а), тест оксидазе (слика 3б) и каталазе (слика 3ц)**.**

Слика 1. Тест хидролизе хипурата: *C. jejuni* даје позитивну хидролизу хипурата (промена боје теста у плаво), док остали термофилни кампилобактери не врше хидролизу и подлога остаје безбојна

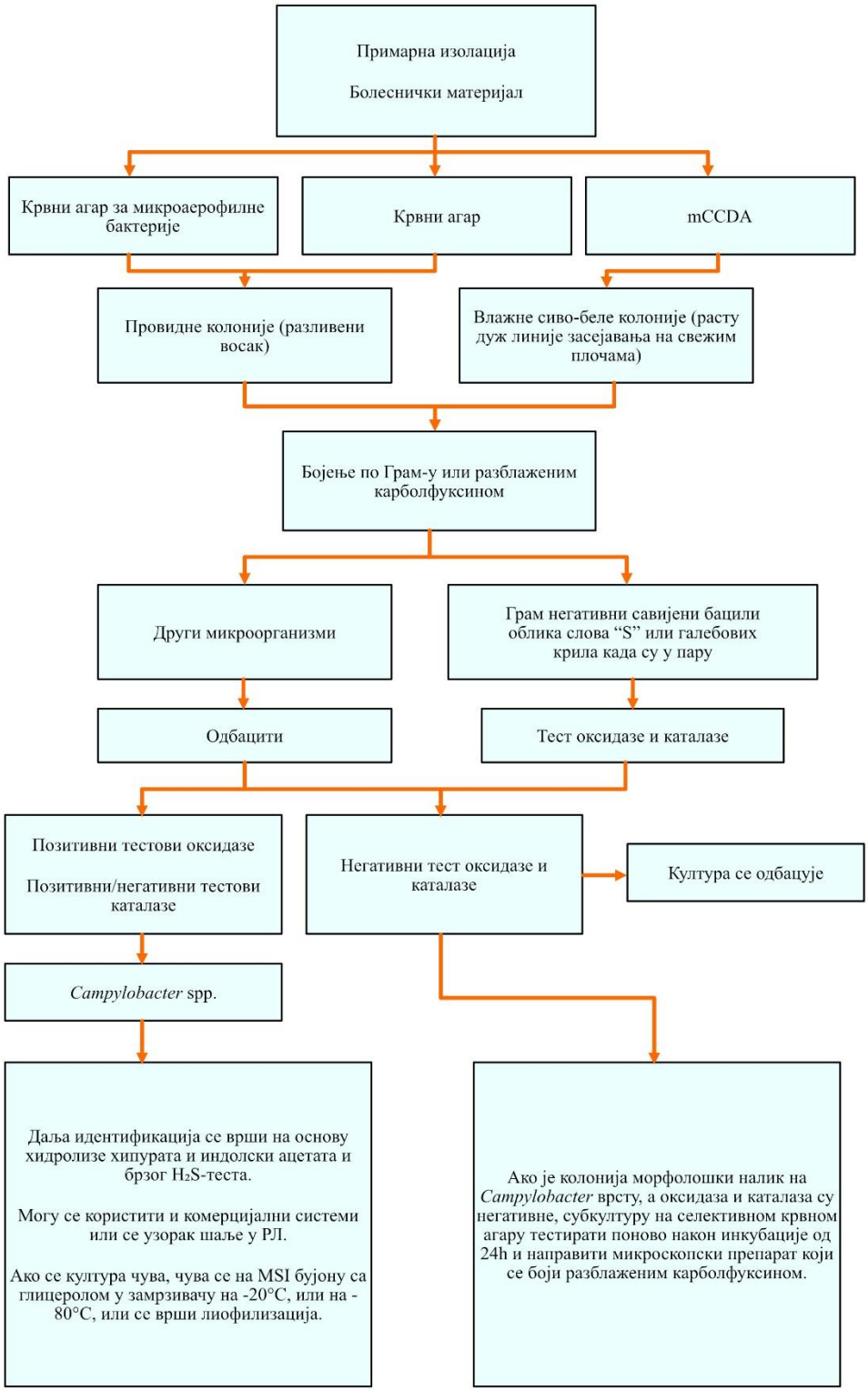


Слика 2. Тестови за идентификацију термофилних кампилобактера: а) *C. jejuni* і *C. coli* врше хидролизу индоксил ацетата; **б)** род *Campylobacter* даје позитиван тест оксидазе, тј. мења се боја колоније у љубичасту; **ц)** већина термофилних кампилобактера поседује ензим каталазу: по додавању H_2O_2 култури, стварају се мехурићи

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Додатак 3: Алгоритам изолације и идентификације

Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије



Овај документ је власништво референтне лабораторије и не сме се умножавати и репродуковати без писане дозволе наведене лабораторије

Литература

L. López, F. J Castillo, A. Clavel, M. C. Rubio: Use of a Selective Medium and a Membrane Filter Method for Isolation of *Campylobacter* Species from Spanish Paediatric Patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (1998) 17:489-492.

2. Nachamkin I. and M. J. Blaser (eds) (2000). *Campylobacter 2nd ed.* ASM Press, Washington, D.C

3. Isenberg H.D. Isenberg, H.D. (2004) Clinical Microbiology Procedure Handbook. American Society for Microbiology, ASM Press.

4.Post, D.E. Food-borne pathogens monograph number 3 Campylobacter. Oxoid .Limited, wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24, UK.

5.Lastovica AJ, le Roux E. Efficient isolation of campylobacteria from stools. J Clin Microbiol. 2000 Jul;38(7):2798-9. doi: 10.1128/JCM.38.7.2798-2799.2000. PMID: 10979752; PMCID: PMC87040.

6. Global Salm-Surv Laboratory Protocols Level 2 Training Course Identification of thermotolerant Campylobacter from faeces 4th Ed. March. 2003. Eds: Hendriksen RS, Wagenaar J., Bergen MvB. A global Salmonella surveillance and laboratory support project of the World Health Organization.