# Стандардни оперативни поступак (СОП)

# Испитивање осетљивости термотолерантних врста у роду *Campylobacter* методом диск дифузије

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*



**Сврха документа**

Сврха овог документа је стандардизација метода за испитивање осетљивости термотолерантних бактерија из рода *Campylobacter*. Документ представља препоруку.

**Принципи теста**

Тестирање диск дифузијом је једна од неколико фенотипских метода испитивања која може да се користи за утврђивање профила осетљивости (антибиограма) микроорганизма. Тестом диск дифузије утврђује се осетљивост *in vitro*.

Принцип агар дифузије је једноставан: плоче агара се инокулишу стандардним инокулумом бактерије, и антибиотски дискови се стављају на инокулисану агар плочу. Дискови коришћени за ову методу садрже стандардизовану количину антимикробног агенса, који дифундује у агар чим дотакне површину агара. Плоче се инкубирају под стандардним условима пратећи EUCAST водич. Током инкубације, антимикробни лек дифундује у агар и инхибира раст бактерија дајући зону инхибиције око диска. Након инкубације, пречник ове зоне се мери и резултати се интерпретирају коришћењем стандардних водича (нпр. EUCAST, CLSI).

Стандардозоване методе су неопходне за испитивања осетљивости за све типове бактерија. Ова испитивања су веома осетљива на варијације као што су: густина инокулума, врста медијума, pH подлоге и услови инкубације. Уз то на агар дифузију утичу: дебљина агара, стопа дифузије антимикробног агенса и стопа раста специфичне бактерије. Да би се осигурала тачност и репродуцибилност резултата теста, мора да се спроводи интерна контрола тестирања и то регуларно како је предвидео EUCAST.

Диск дифузија која је описана у овом протоколу је сагласна са препорукама датим од стране EUCAST-а., в.15. Увек треба да се користи најновија шема за испитивање осетљивости као референца.

**Одговорност**

**Одговорност особља**

Треба погледати одговарајуће приручнике у лабораторији да би се комплетирала одговорност за адекватно спровођење теста.

**Специфични захтеви за безбедност и одговорност**

Све процедуре се спроводе у сагласности са локалним методама сигурне праксе.

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



**Припрема узорка**

Испитивани материјал мора бити чиста култура стара 18–24 сата (инкубирана на 41°C), или до 48 сати стара култура инкубирана на 37°C која је расла на подлогама за изоловање *Campylobacter*-а. Потребно је пикирати појединачну, изоловану колонију.

**Материјал / потребно**

**Подлоге**

- Стерилан физиолошки раствор (ФР) (0.85%) – 3–4 mL по епрувети
- Mueller-Hinton агар плоче са 5% коњске крви (дубина агара приближно 4 mm)

**Дискови антибиотика:** Tetracycline (30µg), Gentamicin (10µg), Ciprofloxacin (5µg), Налидиксична киселина (30µg), Imipenem (10µg), Cefalotin (30µg), Erythromycin (15µg)

**Бактеријски сојеви**

- Испитивани сојеви из рода *Campylobacter*
- Сој за контролу квалитета: *Campylobacter jejuni* ATCC 33560

**Опрема**

- McFarland стандард 0.5 (епрувета која садржи McFarland стандард мора бити истог типа/материјала и пречника као и епрувета која се користи за тест суспензију)
- Нефелометар или бели папир са црним линијама
- Вортекс
- Маказе
- Диск диспензер (алтернативелно може да се користи пинцета)
- Пинцета
- Езе (1 µL и 10 µL)
- Бунзенов пламеник (или неки други који омогућава стерилност пинцете и езе)
- Мали стерилни памучни брисеви или шпатуле по Дригалском ("палице за хокеј")
- Лењир
- EUCAST стандарди за испитивање осетљивости

**Осигурање квалитета**

Сваки лот подлога који се користи у овом СОП-у пре употребе мора да се тестира на контролу квалитета (QC). Резултати QC тестирања (особине и стерилност) треба да се упишу. Само медијуми који прођу QC треба да се користе за испитивање.

Осигурање квалитета ипитивања осетљивости *Campylobacter*-а обухвата испитивање *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. Резултати теста овог микроорганизма морају бити у QC границама које је поставио EUCAST. Тест стога служи као као осигурање квалитета да је метод који се користи са свим факторима варијабли који су стандардизовани према EUCAST водичу. Ако је резултат тестирања *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 изван граница, не саопштавају се резултати.

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



Пре коришћења освеженог соја за QC, треба извршити субкултивацију да би се проверила чистоћа цултуре и да ли је култура жива. Ради се на плочама које се чувају на 4–8°C и субкултивишу недељно . Треба заменити радни сој шток културом барем месечно. Ако се утврди промена у микроорганизму, узима се нови сој из колекције референтних култура (ATCC 33560).

**Процедура**

**1. Дан**

**Стандардизација инокулума:**

Пре прављења инокулума, визуелно испитати плоче агара које садрже сој који ће бити тестиран и оне које садрже контролни сој. Ако култура изгледа мешовито, треба да се припреми свежа субкултура.

Езом или стерилним брисом додирнути врх барем 4 до 5 добро изолованих колонија. Пренети пораст у епрувету са физиолошким раствором (ФР). Емулговати инокулум у епрувети да би се избегло стварање грудвица од бактеријских ћелија унутар епрувете.

Пикирање ћелија са више од једне колоније осигурава селекцију довољног броја бактеријских ћелија и смањује ризик од селекције бактерија које су изгубиле резистенцију.

Дотерати стандард инокулума на 0.5 McFarland-a:

Упоредити густину са стандардом од 0,5 McFarland коришћењем стандарда или папира са црним линијама. Прилагодити густину инокулума да одговара инокулуму стандарда.

McFarland `0,5 одговара приближно броју бактерија од $10^8$ CFU/mL. Коришћење стандардизованог инокулума је есенцијално за тачно извођење испитивања. Ако је суспензија превише светла, неће се добити адекватан пораст. Ако је суспензија превисе густа, величина зона ће бити вештачки мала.

**Инокулатција Mueller-Hinton агара са 5% коњском крвљу (Mueller-Hinton агар + 5% дефибринисана коњска крв и 20 mg/L β-NAD (MH-F))**

Визуелно испитати плочу пре употребе да би се осигурало да су плоче:

-без видљиве контаминације,

-разливене униформно на дебљину од приближно 4мм,

-да нису веома влажне,

-да нису напукле или суве.

Унутар 10 минута од припремања одговарајућег инокулума, уронити стерилан памучни брис у инокулум. Ротирати брис неколико пута и притиснути чврсто на унутрашњи зид епрувете изнад нивоа течности да би се уклонио вишак инокулума из бриса.

Развући брис по целој површини MH-F. Ротирати плочу за око 60° и онда поновити покрете засејавања. Ротирати за 60° поново и, трећи пут, поновити засејавање. Комплетирати инокулацију повлачењем бриса око ивице агара.

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



Хомогено засејавање је важно да би се добили релевантни резултати. Алтернативни метод за добијање конфлуентног пораста јесте инокулација сваке плоче од 10 цм са 50 µл инокулума и притом, користитити шпатулу по Дригалском (hockeystick) да би настао униформан пораст. Ова метода је практична, а према већини лабораторијских искустава, јавља се прихватљива варијација у односу на препоручени стандард.

MH-F плоча треба да се осуши пре инокулације да би се редуковало ројење (на 20-25°C преко ноћи или на 35°C, са склоњеним поклопцем током 15 мин).

Допустити да се вишак влаге са површине агара апсорбује пре стављања антимикробних дискова. Поклопац плоче може бити подигнут на 3-5 минута (не дуже од 15 минута) да би се сваки вишак влаге абсорбовао пре стављања дискова.

**Стављање антимикробних дискова:**

Ставити диск на површину агара диск диспензером или стерилном пинцетом (пинцета може да се стерилише фламбирањем, са алкохолом, избегавати превише загревање пинцете). Не померати дискове након контакта са агаром. После стављања, осигурати да да је диск остварио потпуни контакт са површином агара тако што се диск додирне врхом пинцете.

Дискови не треба да се померају након стављања на површину агара. Дифузија лека почиње одмах након контакта са агаром. Померање диска после контакта са агаром довешће до дисторзије зоне и до неадекватних резултата.

Селектовање дискова треба да је последица величине плоче и намере којом се водите за употребу резултата (клинички или епидемиолошки). Уобичајено је да се не ставља више од 5 дискова на плочу пречника 10 цм и не више од 12 дискова на плочу пречника 15 цм.

**Провера чистоће инокулума:**

Да би се проверила чистоћа инокулума, он се засејава на неселективну подлогу.

Користи се стерилна еза од 10 µL да би се сакупио инокулум из епрувете и засејао на неселективну подлогу).

Инкубирати плоче окренуте дном надоле у микроареобној средини, на температури од 41±1ºC, 24±1h. Изолати са недовољним порастом се после 24h инкубације, реинкубирају а зона инхибиције се чита после укупно 40-48h инкубације. MIC-ови се читају после укупно 40-48h инкубације За контролу квалитета се користи *Campylobacter jejuni* ATCC 33560.

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



**Дан 2. или 3.**

**Читање резултата:**

Проверити чистоћу пораста на контролној плочи. Ако пораст делује мешовито, покушати са добијањем чисте културе.

Проверити да ли је пораст конфлуентан. Могу бити запажене појединачне, резистентне колоније око појединих дискова. Међутим, ако се појединачне колоније налазе преко целе плоче, инокулум је био превисш редак и узорак мора да се поново тестира.

Превише густ инокулум ће дати вештачки премале зоне (ово постаје очигледно када се упореди са резултатима испитивања контролног соја *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) ATCC 33560, са QC-границама датим у табели 1.

Табела 1.

**Граничне вредности *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 (NCTC 11351, CIP 70.2T, DSM 4688, CCUG 11284)**

| Антибиотик | Садржај диска (μг) | Пречник зоне инхибиције (мм) | |
|---|---|---|---|
| | | Циљ | Опсег |
| Ципрофлоксацин | 5 | 38 | 34 - 32 |
| Еритромицин | 15 | 31 | 27- 35 |
| Тетрациклин | 30 | 34 | 30 - 38 |

Проверити да ли су зоне округле. НЕ треба да буду овалне, деформисане или са назубљеним ивицама.

Понекад када се дискови стављају близу један другоме, интеракција између антимикробних лекова може дати дисторзију зона (нпр. антагонизам, синергизам, инхибиицју и/или индукцију ). Оваква додатна информација не треба да се узима за читање зона, али треба да се узме у разматрање када су механизми резистенције у питању.

Ако није другачије назначено, треба прочитати ивице зоне као тачку на којој се не види пораст гледано са предње стране плоче, са поклопцем који је уклоњен и у одбијеном светлу.

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



**Одређивање MIC**

Одређивање MIC-а врши се бујон микродилуцијом према ISO стандарду 20776-1.

**Подлога:** Катјон-подешен Mueller-Hinton бујон + 5% лизиране коњске крви и 20 mg/L β-NAD (MH-F бујон)

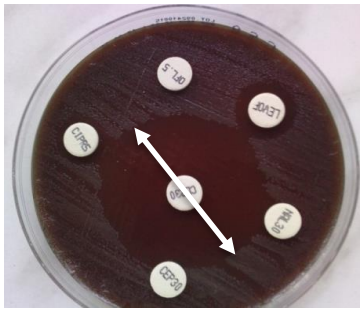
**Инокулум:** $5x10^5$ CFU/mL

**Инкубација:** Микроаеробна средина, 41±1ºC, 24±1h.Изолати са недовољним порастом читају се посе додатних 24h инкубације, тако да се MIC-ови читају после укупно 40-48h инкубације.

**Читање:** Ако није другачије наглашено, читати MIC-ове као најнижу концентрацију антибиотика која потпуно инхибира видљив пораст. (За више информација погледати "EUCAST Reading Guide for broth microdilution").

**Контрола квалитета** (Quality control, QC): *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Campylobacter jejuni* ATCC33560

**Мерење пречника зона инхибиције**. Маргине зона треба да се забележе само тамо где нема очигледног, видљивог пораста (ако постоји замагљени део треба да се занемари) (слика 1). Ако постоје две зоне инхибиције у разматрање се узима ужа зона. Ако је присутна инхибиција пораста до ивице диска бележи се пречник диска (6/9мм).



**Слика 1. Испитивање осетљивости према флуороквинолонима диск-дифузионом методом:** соj *C. jejuni* резистентни према накидиксинској киселини, ципрофлоксацину, офлоксацину и левофлоксацину, осетљив према хлорамфениколу.

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



**Ограничења процедуре**

- Тестирање диск дифузијом, као и свако друго испитивање осетљивости, јесте *in vitro* детерминација антимикробне осетљивости. Ови резултати не морају увек да корелирају са ефикасношћу *in vivo*. Притом, антимикробни лек са ограниченом клиничком осетљивошћу бактерије или антибиотик који је законом забрањен за примену код животиња често су вредни маркер за фенотип специфичне резистенције.

- Тестирање осетљивости диск дифузијом треба да се ради са чистом културом. Може да се укаже на осетљивост иако култура није чиста, али се при том зоне не извештавају. Да би се добили коректни резултати, треба субкултивисати тестирани сој и поновити тестирање.

  Да би се осигурали тачни и репродуцибилни резултати, агар који се користи за диск дифузију треба да испуњава следеће услове према интернационалним водичима (CLSI M2):

  - pH Mueller-Hinton агара треба да буде 7.2 и 7.4 (на собној температури после разливања); на други начин неки антибиотици били би изгубили потенцију док би други агенси имали прејако деловање
  - Варијације у садржају Ca++ i Mg++ у Mueller-Hinton агару утичу на на зону инхибиције за тетрациклин. Зона ће бити превише мала ако је садржај Ca++ i Mg++ превисок или превелика када је садржај Ca++ i Mg++ превише низак.
  - Тестирање QC соја *Campylobacter jejuni* ATCC 33560.
  - Ако су добијене вредности зона унутар прихватљивих пречника према EUCAST-у (најновија верзија) треба наставити са радом.

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



## САОПШТАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

Резултати се изражавају као **S** (осетљив) или **R** (резистентан) у складу са последњом верзијом EUCAST водича.

## РЕФЕРЕНЦЕ


1. Hudzicki J. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*, ASM, 2009.
2. WHO GFN: *Susceptibility testing of Enterobacteriaceae using disk diffusion*, Technical University of Denmark, 2010.
3. CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 30th ed., 2020.
4. EUCAST, *Campylobacter jejuni and C. coli EUCAST Clinical Breakpoint Tablesv. 15.0*, 2025. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_15.0_Breakpoint_Tables.pdf

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



**Прилози**

**Прилог 1: Састав и припрема подлога и реагенса**
**Прилог 2: Пример листа за записивање резултата**
**Прилог 3: Верзија 15 EUCAST**

**Прилог 1: Састав и припрема подлога и реагенса**
Медијуми и реагенси су доступни код неколико компанија као на пример Oxoid, Merck, Difco и други.

**Mueller Hinton агар**
Mueller Hinton агар треба да се припреми од комерцијалне базе за агар.
Треба користити само формуле за Mueller Hinton агар које су биле тестиране и имају одговарајуће стандарде квалитета.
Медијуми се припремају у сагласности са инструкцијама произвођача.
Спецификација: Финални pH 7.2-7.4. Дубина агар 4 mm

**Хранљиви агар**: према ISO 6579:2002
Екстракт меса 3,0г
Пептон 5,0г
Агар 12г до18г
Вода 1000 мЛ
Припрема: Растворити дехидрирани медијум у води загревањам. Ако је неопходно, прилагодити pH на ~7.0 после стерилизације, пренети у бочице и аутоклавирати на 121°C 20 мин. Разлити 15 мЛ растопљеног медијума у стерилне Петри шоље које имају пречник 10 цм.

**Физиолошки Раствор (ФР)**
Натријум хлорид 8.5г
Вода 1000 мЛ
Припрема: Растворити натријум хлорид у води загревањем ако је неопходно. Прилагодити pH на 7.0. Поделити у епрувете тако да се после аутоклавирања на 121°C 20 мин у свакој епрувети добије по 4 мЛ.

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



**Прилог 2: Образац за евиденцију резултата**

**Лист за бележење** Датум:_____ Име:_____

_____

| Антибиотик | Coj 1:# _____ | | Coj2:# _____ | |
|---|---|---|---|---|
| | Пречник зоне (мм) | Интерпретација (P-C) | Пречник зоне (мм) | Интерпретација (P-C) |
| Еритромицин (15μг) | | | | |
| Тетрациклин (30μг) | | | | |
| Гентамицин (10μг) | | | | |
| Ципрофлохацин (5μг) | | | | |
| Налидиксична киселина (30μг) | | | | |
| Имипенем (10μг) | | | | |
| Цефалотин (30μг) | | | | |

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



**Прилог 3: *Campylobacter jejuni* и *C. coli* EUCAST Clinical Breakpoint Tables**

Хомогено засејавање је важно да би се добили реални резултати. Алтернативна метода за стандардно инокулисање плоче је инокулација одређеног волумена суспензије (нпр. 50 µЛ по плочи агара од 10 цм у пречнику) и коришћење шпатула по Дригалском да би се формирао униформан пораст. Изабрани метод као рутински метод треба да обезбеди конфлуентан пораст који даје зоне референтног соја *E. coli* ATCC 25922 унутар QC граница дате од стране EUCAST-а. Добијени пречник зона за референтни сој *C. jejuni* по могућству би треба да је у средини QC-опсега.

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



***Campylobacter jejuni* i *C. coli***

**EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 15.0, važi od 2025-01-01**

**Pravila eksperata i očekivani fenotipovi**

**Vodič**

| **Fluorokvinoloni** | **MIC breakpoints (mg/L)** | | | **Sadržaj diskova (µg)** | **Prečnik zone (mm)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **S ≤** | **R >** | **ATU** | | **S ≥** | **R <** | **ATU** |
| **Ciprofloksacin** | 0.001 | 0.5 | | **5** | 50 | 26 | |

| **Makrolidi** | **MIC breakpoints (mg/L)** | | | **Sadržaj diskova (µg)** | **Prečnik zone (mm)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **S ≤** | **R >** | **ATU** | | **S ≥** | **R <** | **ATU** |
| **Azitromicin** | | | | | | | |
| **Klaritromicin** | | | | | | | |
| **Eritromicin,** *C. jejuni* | 4 | 4 | | **15** | 20 | 20 | |
| **Eritromicin,** *C. coli* | 8 | 8 | | **15** | 24 | 24 | |

| **Tetraciklini** | **MIC brejkpointovi (mg/L)** | | | **Sadržaj diskova (µg)** | **Prečnik zone (mm)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **S ≤** | **R >** | **ATU** | | **S ≥** | **R <** | **ATU** |
| **Doksiciklin** | | | | | | | |
| **Tetraciklin** | 2 | 2 | | **30** | 30 | 30 | |