Стандардни оперативни поступак (СОП)
Изоловање термотолерантних бактерија из рода *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

Изоловање термотолерантних *Campylobacter* -а из столице

Увод

Сврха овог документа је стандардизација метода и поступака за изолацију термотолерантних кампилобактера из столице. Као такав, овај документ није обавезујући. Следећи су поступци неопходни за изоловање термолоерантних бактерија из рода *Campylobacter* из столице.

Изоловање термотолерантних бактерија рода *Campylobacter* из столице

Инфекција *Campylobacter*- ом јавља се или спорадично погађајући појединце и групе као што су породице или се јавља у виду великих ванболничких епидемија. У великим епидемијама може бити откривен као узрочник, али идентификација у спорадичнимм случајевима је често мање успешна. *Campylobacter jejuni* је најчешћи узрочник хуманог ентеритиса мада се изолује и *Campylobacter coli.* Свињско месо је често извор инфекције *Campylobacter*-ом *coli,* али су студије показале разлике између изолата код свиња и људи, указујући да свиње нису главни резервоар инфекције. Међутим, у неким земљана у којима се конзумира значајна количина свињетине, инфекције *Campylobacter*-ом *coli* се чешће јављају. *Campylobacter jejuni* се изолује из пилетине и говеђег меса, али се главним извором инфекције сматра пилетина.

Campylobacter може, такође, бити присутан у столици или храни у малом броју, а бактеријске ћелије могу бити и оштећене. Да би се умањио ризик од добијања лажно негативног резултата примењује се неселективно претходно обогаћивање великог узорка хране на селективнимм подлогама: обогаћивање се врши на селективном бујону за обогаћивање (Престон), а изолација се врши на селективном mCCD-агару.

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

2. Изоловање термотолерантних *Campylobacter-а из столице.*

Материјали

Опрема

- Памучни брис
- Еза за инокулацију (1 µL и 10 µL)
- Инкубатори на 37/42ºC (микроаробно)

Подлоге

- mCCDA плоче
- Крвна Colombia агар плоча која садржи 5% телећу, овчију или коњску крв.
- Узорак столице

Контролни бактеријски сојеви

- *Campylobacter coli* CCUG 11283
- *Campylobacter jejuni* CCUG 11284

Сигурност

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

Процедуре за изолацију из столице

1. дан: Селективно обогаћивање на mCCD агару

Пикирати столицу брисом и развући на mCCD агар плочу. Инкубирати плочу на 37/42 ºC 1 -5 дана у микроаеробним условима

Додатак 1: Техника филтрације

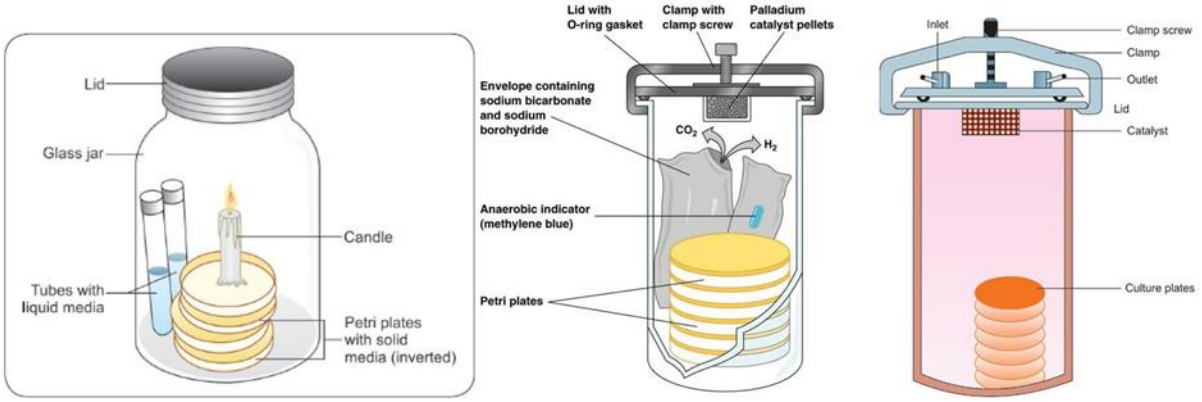
3. дан: Развлачење материјала на Columbia агар плочу са 5% телећом крвљу. Карактеристичан пораст на mCCD-агар плочи се преноси на крвни агар тако да се добију појединачне колоније. Инкубирати у микроаеробној атмосфери преко ноћи на 42ºC·

mCCDA: (Charcoal, cefoperazone, desoxycholate agar – агар са дрвеним угљем, цефоперазоном и дезоксихолатом).

Микроаеробни услови. Ови услови се постижу додавањем CO_2 и $N_{2,}$ што се обезбеђује Campy гас кесицама или применом пумпе, као што је Anoxomat, која замењује ваздух у лонцу за анаеробиозу дефинисаном мешавином гаса. Ако се гас меша одвојено однос треба

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

да буде 6% O_2, 7% CO_2, 7% H_2 и 80% N_2. (слика 1).
Алтернативна метода за добијање микроаеробних услова је: лонац са свећом (слика1).

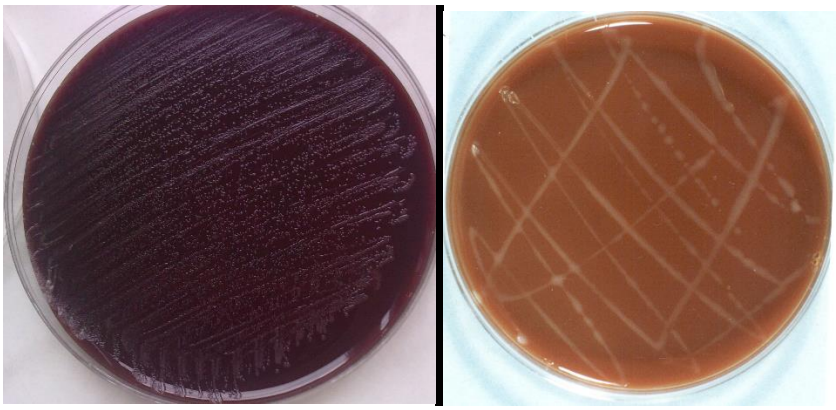


Слика 1

Додатак 2.
Лонац са свећом (Није веома поуздана алтернатива)

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

Типични Campylobacter на mCCD-агару има сивкасте, влажне сливене колоније. *Campylobacter jejuni* ће имати зеленкаст или сивкаст изглед пораста који може бити и веома сув. У исто време изглед може бити са или без металног сјаја.
Кремасто сиве, влажне и испупчене колоније су типичне за *Campylobacter coli.* Међутим, на основу изгледа колонија није могуће одредити специјес (слика 2).



Слика 2.

2. Састав и припрема подлога за култивацију и реагенаса

Готове подлоге и реагенси су доступни код компанија као што су Oxoid, Merck, Difco и друге. Састав дехидратисаних медијума дат је у прилогу, и може мало да варира међу различитим произвођачима. Такође, подлоге треба да се припремају према упутству произвођача, ако се опис разликује од оног који је дат овде.

Прилог

mCCD-агар

Campylobacter селективна агар база без крви (Oxoid, CM739) 45,5 г
Екстракт меса 10,0 г
Ензимски дигест животињског ткива 10,0 г
Натријум хлорид 5,0 г
Дрвени угаљ 4,0 г
Хидролизат казеина 3,0 г
Натријум дезоксихолат 1,0 г
Гвожђе сулфат 0,25 г
Натријум пируват 0,25 г

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

Агар 8,0 г до 18,0 г
Вода до 1 000 мл
2 бочице mCCDA селективног суплемента (Oxoid, SR 155E)
које садрже: (по литру)
Цефоперазон 32 мг
Амфтерицин-Б 10 мг

Растворити Campylobacter Агар Базу у води и загревањем ако је неопходно. Аутоклавирати на 121ºC током 15 минута. Додати свакој од бочица 2 мл стрерилне воде. Растворити нежно. Додати селективни суплемент у Campylobacter Агар Базу, загрејану на 50ºC. Разлити плоче са око 15-20 мл растопљене подлоге у сваку Петри-шољу.

Columbia-агар
Columbia агар база (Охоид CM331) 45 г
Вода 1000 мл

Растворити Агар Базу у води, и оставити да стоји 15 мин. Раствор треба да прокључа током 15 мин., а pH ~ треба да износи приближно 7,1-7,5. Подлога се налива у боце од 1000 мл и аутоклавира на 121ºC током 15 мин.

Columbia-агар са телећом крвљу
Columbia агар 950 мл
Телеће крви 50 мл
Отопити агар и дотерати температуру да износи око 50°C и додати телећу крв. Разлити око 15-20 мл отопљеног медијума у сваку Петри шољу.

3. Додатак 1:
Техника филтрације
Стерилни целулозни ацетатни филтер са порама величине 0.45µ ставља се на површину Mueller-Hinton агара са 5% крвљу. Узорци столице се емулгују (1 г у 1 мл физиолошког раствора), а онда се 10-15 капи суспензије стави на врх мембране и допусти се да се пасивно изфилтрира током 30-40 мин.
Након филтрације, филтер се уклања, а култивисана плоча се инкубира током 1-2 дана на 37-41^{0}C (у микроаеробним условима).

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

4. Додатак 2:
Лонац са свећом

Сврха:
Лонац са свећом ствара атмосферу са смањеном количином кисеоника и повећаном количином угљен диоксида. Ови услови побољшавају раст микроаерофила.

Принцип:
Пламен свеће у затвореној средини ће искористити известан проценат кисеоника (слика 2.). Када се доступан кисеоник редукује, а повећа концентрација угљендиоксида, пламен ће нестати. Засејани медијуми у овој атмосфери побољшаће раст неких бактерија. Лонац са свећом се обично инкубира на 35-37^{o}C·

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

Литература

1.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 Isolation 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.

7. BNO Team Cultivation of Anaerobic Bacteria. Last Updated March 27, 2024 0 revisions https://biologynotesonline.com/cultivation-of-anaerobic-bacteria/