Стандардни оперативни поступак (СОП)

ЧУВАЊЕ И ОДРЖАВАЊЕ КОНТРОЛНИХ СОЈЕВА

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

Чување и одржавање контролних сојева

Субкултивација и одржавање сојева за контролу квалитета

А. Намена и референце

Неправилно складиштење и поновљена субкултивација сојева за контролу квалитета рада могу довести до промена у резултатима антимикробне резистенције и другим неправилностима.

Следећи текст се може сматрати резимеом информација којих се треба држати при субкултивацији и одржавању сојева за контролу квалитета када се изводе дилуционе и друге методе за тестирање антимикробне резистенције (АМР).

Б. Дефинисање израза (термина)

Референтна култура: референтна култура је сој микроорганизма који је издвојен из збирке типова култура.

Шток референтних култура: шток референтних култура је узорак микроорганизама који се налази у лабораторији, а изведен је из збирке типова култура.

Шток култура са којима се ради: Шток култура са којима се ради је пораст изведен из штока референтних култура. Смернице и стандарди наводе како референтне културе треба обрадити и складиштити.

Субкултуре : субкултура је пренос културе микроорганизма са једног медијума на други. Пораст на другом свежем медијуму представља субкултуру.

В. Важна разматрања:

- Не користити сојеве са диск дифузије за одређивање МИК-а.
- Добити сојеве за контролу квалитета из поузданих извора као нпр. АТЦЦ.
- Било која измена материјала или процедуре мора бити одобрена од стране контроле квалитета пре него што се изврши.
- На пример: агар и дилуционе методе могу дати различите опсеге МИК-а за лекове.
- Повремено изводити бројање колонија да би се потврдила процедура за припремање инокулума.
- Најбоље би било да се вредности теста налазе у средини прихватљивог опсега.

Г. Складиштење референтних сојева

Припрема штока културе:

- Користити погодан стабилизатор као што је 50% фетални телећи серум у бујону, 10-15% глицерол у триптичном сојином бујону, дефибринисана овчја крв или обрано млеко, за припрему бројних аликвота.
- Складиштити на -20,-70^{o}C или у течном азоту (или сувом замрзнутом).

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

Културе за рад:

- Поставити на коси агар са адекватним медијумом, складиштити на 4-8ºC и пресејавати једном недељно.
- Заменити сој са којим се ради са културом која је складиштена минимум једном месечно.

Д. Учесталост тестирања

Недељно и дневно тестирање

Недељно тестирање је могуће ако лабораторија показује задовољавајући учинак дневним тестирањем у сагласности са описом у CLSI водичима.

- Документација показује резултате референтног соја од 20 до 30 узастопних дневних тестирања који су били унутар прихватљивог опсега.
- За сваку комбинацију лек-микроорганизам, не више од 1 у 20 или 3 у 30 МИК вредности сме да буде изван прихватљивог опсега.

Када је све горенаведено испуњено, сваки контролни сој треба тестирати једном недељно или при промени било које компоненте тестирања.

Корективне мере :

Ако је МИК у недељном тестирању изван опсега, потребно је исправка на следећи начин:

- Поновити тестирање ако постоји очигледна грешка нпр. погрешан сој или услови инкубисања.
- Ако не постоји очигледна грешка, вратити се на дневно тестирање квалитета.

Ако се проблем не може решити, наставити дневна тестирања док се не открије грешка.
Понављати валидацију 30 дана пре резимирања недељног тестирања.

Сугерисана процедура за употребу референтних сојева

Након примања сертификоване културе, треба записати све релевантне информације (нпр. датум примања, број соја, тип соја, добављача и број серије).

Увек рукујте референтним сојевима у асептичним условима (нпр.у ламинарној комори).

Као што је назначено у алгоритму (Слика 1), отворите лиофилизиране културе из одређене збирке микроорганизама (http://www.eurl-ar.eu/208-eqas.htm), следећи смернице те збирке доступне на одређеном сајту, додајте 1 мЛ бујона (нпр. хранљивог бујона) у лиофилизирани материјал, инкубирајте 1 сат на одговарајућој температури, пренесите 1-3 капи на четири плоче с агаром (нпр. крвни агар) и развуците помоћу езе. или, ако рукујете културом са штапића, развуците културу на четири плоче агара.

Након инкубације преко ноћи на релевантној температури, додајте 4 mL LB + 15% глицерола у сваку од четири агар плоче (=> укупно 16 mL) и пренесите 1 mL у 11 појединачних крио епрувета. Извршите контролу чистоће са сваке плоче с агаром тако што ћете сакупити нешто

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

преосталог бујона омчастом езом и засејати нову плочу с агаром (нпр. крвни агар). Након инкубације преко ноћи на одговарајућој температури, проверите чистоћу. Ако култура није чиста, баците све крио епрувете направљене од те плоче. Забележите резултате за потребе осигурања квалитета.

Означите две епрувете "РЕФ". Реч је о субкултури број 1 и користиће се за производњу новог сета 'зелених' крио епрувета (референтни сојеви за радне културе). Чувајте крио епрувете с ознаком "РЕФ" на -80 °C у црвеним (или на други начин, лако препознатљивим) кутијама с ознаком "Референтни сојеви".

Радне културе се производе из епрувета које се налазе у зеленој кутији (специфичности у вези са руковањем радним културама описане су на другом месту, нпр. CLSI M07-09 Додатак Е):

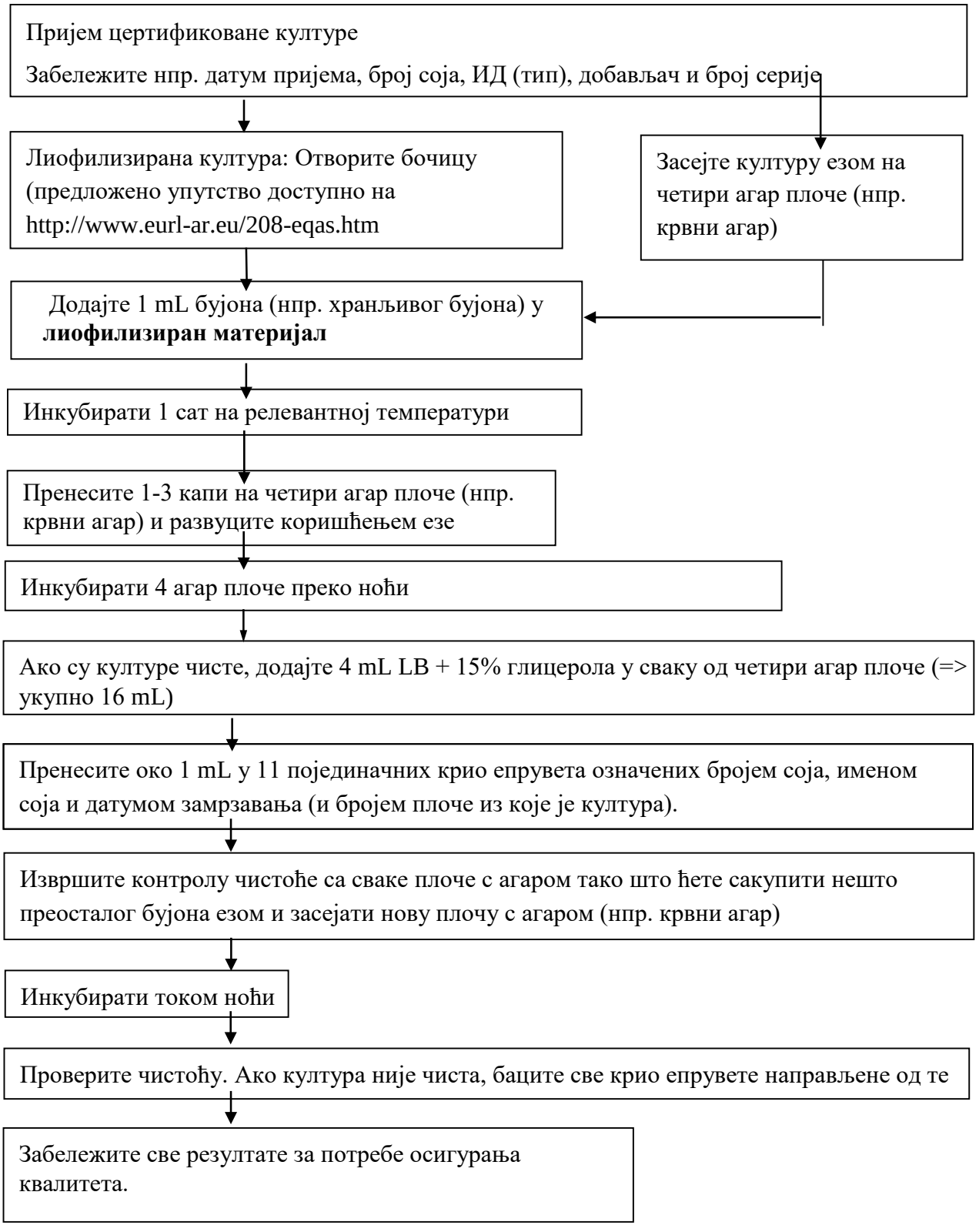
- Састружите материјал са још смрзнуте културе и езом засејте плочу агара (нпр. крвни агар), вратите још замрзнуту културу у замрзивач.
- Инкубирајте преко ноћи на одговарајућој температури.
- Означите плочу са идентитетом соја, датумом субкултуре и именом особа које обављају процедуре.
- Региструјте да је направљена радна култура (за систем контроле квалитета)

Када почнете користити последњу крио епрувету референтног соја из зелене кутије, субкултивишите 'РЕФ' крио епрувету за тај сој на четири агар плоче (нпр. крвни агар). Направите девет нових крио епрувета следећи горе описану процедуру (укључујући контролу чистоће). Ставите оригиналну "РЕФ" епрувету у црвену кутију након употребе.

Замрзнути референтни сој може бити субкултивисан највише четири пута (пет пасажа из АТСС референтне културе) да би се задржао АТСС број, те стога водите евиденцију о томе колико је пута референтни сој субкултивисан тако што ћете водити релевантну евиденцију.

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

Слика 1: Алгоритам



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

4 . Референце

1 Правилник о превентивним мерама за безбедан и здрав рад при излагању биолошким штетностима. Службани гласник РС. Бр 96/20 и 115/20. 2. Laboratory biosafety manual, fourth edition. Geneva: World Health Organization; 2020 (Laboratory biosafety manual, fourth edition and associated monographs). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/337956/9789240011311-eng.pdf?sequence=1 3. National Food Institute, Technical University of Denmark. Suggested procedure for handling of reference strains. Kongens Lyngby, Denmark: 2012. Available at: https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/25-resourcer/329_handlingreferencestrains-dec2012-6.pdf

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

Прилог 1. Пример картона контролне културе

Назив *Campylobacter jejuni*	**Ознака** ATCC	**Лабораторијски код у колекцији**	
Произвођач Microbiologics USA	**Облик** Лиофилизат (Kwick stick)	**Серија**	**Рок употребе** Датум
Сврха Контрола антибиограма	**Реконституција** Датум	**Референтни шток (2 ком)** Датум Датум Датум Датум Датум...	**Шток радних култура (9 ком)** Датум Датум Датум Датум Датум...
Месечни депозит ултраниска темп.	**Месечни депозит 2-8°C**	**Датум пасаже**	**Одговоран техничар**
Јануар			
Фебруар			
Март			
Април			
Мај			
Јун			
Јул			
Август			
Септембар			
Октобар			
Новембар			
Децембар			