**SZO centar za saradnju**

**Osiguranje spoljne kontrole kvaliteta (EQAS)**

**ČUVANJE I ODRŽAVANJE KONTROLNOH SOJEVA**

Subkultivacija i održavanje sojeva za kontrolu kvaliteta

1. Namena i reference

Nepravilno skladištenje i ponovljena subkultivacija sojeva za kontrolu kvaliteta rada mogu dovesti do promena u rezultatima antimikrobne rezistencije I drugim nepravilnostima.

Sledeći tekst se može smatrati rezimeom informacija kojih se treba držati pri subkultivaciji i održavanju sojeva za kontrolu kvaliteta kada se izvode dilucione i druge metode za testiranje antimikrobne rezistencije (AMR).

1. Definisanje izraza (termina)

Referentna kultura: referentna kultura je soj mikroorganizma koji je izdvojen iz zbirke tipova kultura.

Štok referentnih kultura: štok referentnih kultura je uzorak mikroorganizama koji se nalazi u laboratoriji, a izveden je iz zbirke tipova kultura.

Štok kultura sa kojima se radi: Štok kultura sa kojima se radi je porast izveden iz štoka referentnih kultura. Smernice i standardi navode kako referentne kulture treba obraditi i skladištiti.

Subkulture: subkultura je prenos kulture mikroorganizma sa jednog medijuma na drugi. Porast na drugom svežem medijumu predstavlja subkulturu.

1. Važna razmatranja:

* Ne koristiti sojeve sa disk difuzije za odredjivanje MIK-a.
* Dobiti sojeve za kontrolu kvaliteta iz pouzdanih izvora kao npr ATCC.
* Bilo koja izmena materijala ili procedure mora biti odobrena od strane kontrole kvaliteta pre nego što se izvrši.
* Na primer: agar i dilucione metode mogu dati različite opsege MIK-a za lekove.
* Povremeno izvoditi brojanje kolonija da bi se potvrdila procedura za pripremanje inokuluma.
* Najbolje bi bilo da se vrednosti testa nalaze u sredini prihvatljivog opsega.

1. Skladištenje referentnih sojeva

Priprema štoka kulture:

* Koristiti pogodan stabilizator kao što je 50% fetalni teleći serum u bujonu, 10-15% glicerol u triptičnom sojinom bujonu, defibrinisana ovčja krv ili obrano mleko, za pripremu brojnih alikvota.
* Skladištiti na -20,-70oC ili u tečnom azotu (ili suvom zamrznutom).

Kulture za rad:

* Postaviti na kosi agar sa adekvatnim medijumom, skladištiti na 4-8oC i presejavati jednom nedeljno.
* Zameniti soj sa kojim se radi sa kulturom koja je skladištena minimum jednom mesečno.

1. Učestalost testiranja

Nedeljno vs dnevno testiranje

Nedeljno testiranje je moguće ako laboratorija pokazuje zadovoljavajući učinak dnevnim testiranjem u saglasnosti sa opisom u CLSI vodičima.

* Dokumentacija pokazuje rezultate referentnog soja od 20 do 30 uzastopnih dnevnih testiranja koji su bili unutar prihvatljivog opsega.
* Za svaku kombinaciju lek-mikroorganizam, ne više od 1 u 20 ili 3 u 30 MIK vrednosti sme da bude izvan prihvatljivog opsega.

Kada je sve gorenavedeno ispunjeno, svaki kontrolni soj treba testirati jednom nedeljno ili pri promeni bilo koje komponente testiranja.

Korektivne mere :

Ako je MIK u nedeljnom testiranju izvan opsega, potrebno je ispravka na sledeći način:

* Ponoviti testiranje ako postoji očigledna greška npr. pogrešan soj ili uslovi inkubisanja.
* Ako ne postoji očigledna greška, vratiti se na dnevno testiranje kvaliteta.

Ako se problem ne može rešiti, nastaviti dnevna testiranja dok se ne otkrije greška.

Ponavljati validaciju 30 dana pre rezimiranja nedeljnog testiranja.

Sugerisana procedura za UPOTREBU REFERENTNIH SOJEVA

Nakon primanja sertifikovane kulture, treba zapisati sve relevantne informacije (npr. datum primanja, broj soja, tip soja, dobavljača i broj serije).

Uvek rukujte referentnim sojevima u aseptičnim uslovima (npr.u laminarnoj komori).

Kao što je naznačeno u algoritmu (Slika 1), otvorite liofilizirane kulture iz određene zbirke mikroorganizama (<http://www.eurl->  [ar.eu/208-eqas.htm),](http://www.eurl-ar.eu/208-eqas.htm) sledeći smernice te zbirke dostupne na određenom sajtu, dodajte 1 mL bujona (npr. hranjivog bujona) u liofilizirani materijal, inkubirajte 1 sat na odgovarajućoj temperaturi, prenesite 1-3 kapi na četiri ploče s agarom (npr. krvni agar) i razvucite pomoću eze. ili, ako rukujete kulturom sa štapića, razvucite kulturu na četiri ploče agara.

Nakon inkubacije preko noći na relevantnoj temperaturi, dodajte 4 mL LB+15% glicerola u svaku od četiri agar ploče (=> ukupno 16 mL) i prenesite 1 mL u 11 pojedinačnih krio epruveta. Izvršite kontrolu čistoće sa svake ploče s agarom tako što ćete sakupiti nešto preostalog bujona omčastom ezom i zasejati novu ploču s agarom (npr. krvni agar). Nakon inkubacije preko noći na odgovarajućoj temperaturi, proverite čistoću. Ako kultura nije čista, bacite sve krio epruvete napravljene od te ploče. Zabeležite rezultate za potrebe osiguranja kvaliteta.

Označite dve epruvete “REF”. Reč je o subkulturi broj 1 i koristiće se za proizvodnju novog seta ‘zelenih’ krio epruveta (referentni sojevi za radne kulture). Čuvajte krio epruvete s oznakom “REF” na -80℃ u crvenim (ili na drugi način, lako prepoznatljivim) kutijama s oznakom “Referentni sojevi”.

Radne kulture se proizvode iz epruveta koje se nalaze u zelenoj kutiji (specifičnosti u vezi sa rukovanjem radnim kulturama opisane su na drugom mestu, npr. CLSI M07-09 Dodatak E):

* Sastružite materijal sa još smrznute kulture i ezom zasejte ploču agara (npr. krvni agar), vratite još zamrznutu kulturu u zamrzivač.
* Inkubirajte preko noći na odgovarajućoj temperaturi.

- Označite ploču sa identitetom soja, datumom subkulture i imenom osoba koje obavljaju procedure.

- Registrujte da je napravljena radna kultura (za sistem kontrole kvaliteta)

Kada počnete koristiti poslednju krio epruvetu referentnog soja iz zelene kutije, subkultivišite 'REF' krio epruvetu za taj soj na četiri agar ploče (npr. krvni agar). Napravite devet novih krio epruveta sledeći gore opisanu proceduru (uključujući kontrolu čistoće). Stavite originalnu “REF” epruvetu u crvenu kutiju nakon upotrebe.

Zamrznuti referentni soj može biti subkultivisan najviše četiri puta (pet pasaža iz ATCC referentne kulture) da bi se zadržao ATCC broj, te stoga vodite evidenciju o tome koliko je puta referentni soj subkultivisan tako što ćete voditi relevantnu evidenciju.

**Slika 1:** Algoritam

Prijem certifikovane kulture

Zabeležite npr. datum prijema, broj soja, ID (tip), dobavljač i broj serije

Zasejte kulturu ezom na četiri agar ploče (npr. krvni agar)

Liofilizirana kultura: Otvorite bočicu (predloženo uputstvo dostupno na http://www.eurl-ar.eu/208-eqas.htm

Dodajte 1 mL bujona (npr. hranljivog bujona) u **liofiliziran materijal**

Inkubirati 1 sat na relevantnoj temperaturi

Prenesite 1-3 kapi na četiri agar ploče (npr. krvni agar) i razvucite korišćenjem eze

Inkubirati 4 agar ploče preko noći

Ako su kulture čiste, dodajte 4 mL LB+15% glicerola u svaku od četiri agar ploče (=> ukupno 16 mL)

Prenesite oko 1 mL u 11 pojedinačnih krio epruveta označenih brojem soja, imenom soja i datumom zamrzavanja (i brojem ploče iz koje je kultura).

Izvršite kontrolu čistoće sa svake ploče s agarom tako što ćete sakupiti nešto preostalog bujona ezom i zasejati novu ploču s agarom (npr. krvni agar)

Inkubirati tokom noći

Proverite čistoću. Ako kultura nije čista, bacite sve krio epruvete napravljene od te ploče

Zabeležite sve rezultate za potrebe osiguranja kvaliteta.