

UPUTSTVO ZA IZOLOVANJE, IDENTIFIKOVANJE, ČUVANJE I TRANSPORT *Campylobacter-a*

Campylobacter jejuni i *C.coli* je danas su vodeći uzročnici dijarejnog sindroma kod ljudi u razvijenim zemljama. Najčešća manifestacija kampilobakteroze jeste dijareja koja može biti krvava, grčevi i abdominalni bol. Neke inficirane osobe nemaju nikakve simptome. Kod osoba sa kompromitovanim imunskim sistemom, *Campylobacter* može da dospe u krvotok i da izazove infekcije opasne po život. *Campylobacter* se izoluje kod dece i mladih češće nego kod drugih starosnih grupa. Gotovo svi oboleleli se oporave bez posebnog lečenja, ali je kod teških slučajeva lek izbora eritromicin.

Većina obolelih se oporavi potpuno za nekoliko dana. Međutim, posle infekcije *C. jejuni* mogu nastati teške postinfekciozne komplikacije na koštano- zglobnom sistemu (reaktivni artritis) ili neurološke komplikacije kao što je postinfektivna polineuropatija Guillain-Barréov sindrom (GBS) i Miller Fisherov sindrom (MFS). Procenjeno je da se na oko 1000 slučajeva oboljevanja od kampilobakterioze javlja jedan GBS, a da je čak i do 40% svih GBS pretodila infekcija kampilobakterom. Stoga se smatra da je *C. jejuni* jedan od vodećih uzročnika ovih manifestacija, kao i da one imaju težu kliničku sliku, ako im prethodi dijareja izazvana *C.jejuni*. Takođe, ako se bakterija izoluje ili se serološki potvrdi infekcija, neophodno je uključivanje antibiotika u terapiju.

Infekcija *Campylobacter-om* se uglavnom prenosi nedovoljno termički obrađenim mesom (najčešće živinskim) i kontaminacijom druge hrane tokom obrade svežeg mesa. Prenosnje kontaktom je retko, ali moguće.

MIKROBIOLOŠKA DIJAGNOZA

Veći broj infekcija može dovesti do dijareje ili do krvave dijareje. Stoga se infekcija *Campylobacter-om* dijagnostikuje kultivacijom, najčešće, stolice.

IZOLOVANJE *Campylobacter-a* Bolesnički materijal i hranljive podloge

Stolica

Campylobacter se izoluje na beskrvnim selektivnim podlogama kao što je mCCDA zato što na njemu rastu i *C. fetus*, *C. jejuni* i *C. coli* i *C. lari*. Ako nije moguće koristi se krvna selektivna podloga (po Skirrow-u, Butzler-u, Blaser-u ili neka druga) na kojoj očekujemo *C.fetus* (ređe), *C. jejuni* i *C. coli*. Jedan materijal se zasejava na jednu ploču.

Krv

Materijal se zasejava na jednu neselektivnu obogaćenu podlogu (krvni agar sa 5% ovčije krvi, Columbia-krvni agar, Brucella-krvni agar). Jedan materijal se zasejava na jednu ploču.

Drugi materijal

Materijal se zasejava na neselektivnu obogaćenu podlogu (krvni agar sa 5% ovčije krvi, Columbia agar, Brucella agar) ako se radi o sterilnom materijalu. Materijal se zasejava na selektivnu obogaćenu podlogu sa krvlju (po Skirrow-u, Butzler-u, Blaser-u ili

neka druga) ili na beskrvnu podlogu mCCDA ako se radi o nesterilnom materijalu. Jedan materijal se zasejava na jednu ploču.

Uslovi za inkubaciju

Mikroaerofilni uslovi (5 % kiseonik, 10% CO₂, 85% azot) se najčešće postižu kesicama za mikroaerofiliju u loncu za anaerobe ili na neki drugi način (sistemom evakuacije i zamene mešavinom gasa: 10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂, što daje mikroaerofilnu atmosferu) ili plastičnim kesama sa generatorima za mikroaerofiliju, ako laboratorija ima za to uslove.

Treba koristiti kesice za mikroaerofiliju koje stvaraju H₂ i CO₂ i sadrže katalizator. Ako ne sadrže katalizator on se posebno stavlja u lonac. Svaki put kada se lonac otvori stavlja se nova kesica. Prema nekim autorima, ne stavlja se više od 6 ploča u loncu. Inkubacija se vrši na temperaturi od 37°C.

IDENTIFIKOVANJE SOJEVA

Biohemijske osobine *Campylobactera*

Mikroorganizam	Katalaza	oksidaza	Hidroliza hipurata	Hidroliza indoksil acetata	Osetljivost na nalidiksinsku kiselinu	Osetljivost na cefalotin
<i>C. jejuni</i>	+	+	+	+	S	R
<i>C. coli</i>	+	+	-	+	S	R
<i>C. lari</i>	+	+	-	-	R	R
<i>C. fetus</i>	+	+	-	-	Varijabilno	S

Hidroliza hipurata (*C. jejuni* je pozitivan)

Hidroliza indoksil acetata (*C. fetus* je negativan)

Temperatura rasta (*C. fetus* nije termofilan, raste na 25°C)

Osetljivost prema:

Nalidiksičnoj kiselini (*C. jejuni*; *C. coli* osetljivi):

Cefalotinu (*C. jejuni*; *C. coli*, *C. lari* su otporni, *C. fetus* osetljiv)

Napomena:

Ako se traže samo termofilni kampilobakteri u stolici materijal se inkubira na 42°C. Diferenciranje *C. jejuni* i *C. coli* vrši se testom hidrolize hipurata i osetljivosti prema nalidiksinskoj kiselini i cefalotinu.

ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI

Preporučuje se ispitivanje osetljivosti disk difuzijom, na neselektivnoj podlozi sa 5% krvi (Mueller-Hinton-ov agar sa 5% ovčije krvi prema CLSI), po metodi Kirby Bauer-a i to prema eritromicinu (15 µg) i ciprofloksacinu (5 µg), zbog njihove eventualne primene u terapiji, kao prema nalidiksinskoj kiselini (30 µg) i cefalotinu (30 µg) za identifikaciju (dovoljna je jedna Petri-ploča za četiri tablete).

Ispitivanje osetljivosti na eritromicin i flourokvinolone obavezno je za bolničke sojeve. Radi se disk-difuzionom metodom prema preporukama EUCAST-a (http://www.eucast.org/zone_diameter_distributions/). Ssoj je rezistentan prema eritromicinu ako je zona inhibicije 6(9)-20 mm za *C. jejuni* i 6(9)-24 mm za *C. coli*; soj je rezistentan prema ciprofloksacinu ako je zona inhibicije 6(9)-26 mm i za *C. jejuni* i za *C.coli*.

ČUVANJE SOJEVA

Izolovani *Campylobacter* se subkultiviše radi dobijanja čiste kulture i umnožavanja, na jednoj neselektivnoj i jednoj selektivnoj podlozi. Zatim se nekoliko punih eza kulture prenese u po dve male epruvete sa zatvaračima ili ependorfice sa po 1 ml moždano srčanog infuzionog bujona (MSI; Brain Hart Infusion broth - BHI) sa 30% glicerola. Kultura se dobro suspenduje (na "vortexu"), zatvori i odloži na -20°C ili još bolje na -70°C, dok se ne prikupe ostale kulture *Campylobacter-a* za taj period. Na -20°C kulture se ne čuvaju duže od tri meseca. Kulture se šalju svaka tri meseca, kvartalno.

OSVEŽAVANJE SOJEVA

Epruvete se izvade i odlede se na sobnoj temperaturi. Potom se ezom prenese kultura na jednu selektivnu i jednu neselektivnu hranljivu podlogu. Koriste se isključivo sveže ploče. Ako nema porasta posle zasejavanja, celokupna preostala količina tečne kulture se izlije na jednu ploči i razvuče ezom.

TRANSPORT SOJEVA

Kao transportna podloga može da se koristi Stuart-ova, Preston-ova, Wang-ova, modifikovana Willkins-Chalgran-ova podloga ili, eventualno, moždano srčani infuzioni bujon sa 30% glicerola. Podloge se pre upotrebe čuvaju na +4°C.

Sa podloge na kojoj je osvežena kultura, brisom se pokupi najveća moguća količina kulture, inokulira se transportna podloga, bris se zalomi pincetom i ostane u polučvrstoj podlozi. Epruveta se zatvori i zapečati. Ako se koriste Wang-ova i Willkins-Chalgran-ova podloga, posle inokulacije kulturom, mogu da se inkubiraju preko noći na 37°C. Transportne podloge mogu da se šalju i odmah nakon inokulacije.

Transport se vrši se ekspres-poštom ili kao postoji komunikacija sa IZJZ, Niš, u ručnom frižideru, kolima.

Napomena: Potrebno je da RL obavestite desetak dana pre nego pošaljete kulture. Za sve potrebne informacije možete kontaktirati RL direktno; telefonom: 018 4226-448, 4226-384 lok. 179; e-mailom: mikrobiologija@izjz-nis.org.rs; preko sajta: www.izjz-nis.org.rs.