

Uputstvo za transport, izolovanje i čuvanje kultura *H. pylori*

Kultivacija *H. pylori* je veoma pouzdana metoda koja omogućuje i testiranje antibiotske osetljivosti. Ipak, kultivacija *H. pylori* je zahtevna naročito kod pacijenata koji su predhodno uzimali antibiotike, antagoniste H₂ receptora ili inhibitore protonске pumpe. Uspešnost kultivisanja *H. pylori* u najvećoj meri zavisi od broja uzetih biopsijskih uzoraka kao i od uslova kultivacije.

Za mikrobiološko ispitivanje potrebno je uzeti najmanje dva uzorka bioptata antruma želuca, jedan za mikroskopski pregled a drugi za kultivaciju. Medjutim, kod pacijenata koji su primali inhibitore protonске pumpe, bar jedan uzorak bioptata treba uzeti iz korpusa želuca. Sve uzorke treba čuvati na 4°C pre i nakon transporta u laboratoriju.

Transport bioptata

1. Ukoliko se uzorak transportuje u laboratoriju unutar jednog sata onda je moguće koristiti 0.9 % NaCl (po 0.5ml tečnosti).
2. Kod dužeg transporta primenjuje se Brucella bujon Pravi se po preporuci proizvođača sa dodatkom 0.5% goveđeg serum albumina. Potrebno je po tri mililitra ove transportne podloge staviti u epruvete sa zatvaračem.

Alternativne transportne podloge

- a. 20% rastvor glukoze
- b. polučvrsta Stuartova transportna podloga. U ovoj podlozi *H. pylori* preživljava 6h na temperaturi do 15°C, ili 48h ako se čuva na 4°C.
- c. MSI sa 20% glicerola

Kultivacija na čvrstim podlogama

Inokulacija *H. pylori* vrši se na jednu selektivnu podlogu sa dodatkom antibiotika i jednu neselektivnu podlogu bez dodatka antibiotika (na primer, moždano srčani infuzioni agar). Za izolaciju *H. pylori* preporučuje se korišćenje sveže pripremljenih vlažnih podloga (moguće je sveže pripremljene podloge staviti u plastičnu kesu, zavezati i čuvati na 4°C i tako koristiti unutar dve nedelje). U svaku podlogu dodaje se puna krv ili krv lizirana saponinima (7%) koju je potrebno dobro izmešati sa tečnim agarom da bi se dobila ravnomerna distribucija.

Krvne agar baze:

1. moždano srčani infuzioni (Brain Heart infusion-BHI) agar
2. Brucella agar
3. Columbia blood agar
4. Columbia blood agar sa Dents *H. pylori* selective supplement
5. Komercijalne gotove podloge

Antibiotski suplement za selektivnu hranljivu podlogu (10 mg/l vancomycin, 10 mg/l amphotericin, 5 mg/l cefsulodin, 5 mg/l trimethopim)

Lonci za inkubaciju, atmosfera i temperatura inkubacije
(5-7% O₂, 5-10% CO₂)

Odgovarajuća atmosfera postiže se primenom gas produkujućih kitovi za campylobacter .Vlažna atmosfera u loncu za kultivaciju postiže se stavljanjem vlažnog filter papira ili vlažne vate na dno lonca. Posle svake upotrebe očistiti lonce dezinfekcionim sredstvom. Temperatura inkubacije treba biti 37°C.

Identifikacija *H. pylori* postiže se testovima oksidaze, katalaze i ureaze.

Mikroskopiranje

Uzeti uzorak bioptata iz transportne podloge sterilnom pincetom. Staviti ga u 0.5ml NaCl ili u transportnu tečnu podlogu. Uzorak koji služi za mikroskopiranje ne treba gnječiti. Isecite mali ugao biopsije za mikroskopiranje i razmažite preko pločice za mikroskopiranje. Ukoiko su dva uzorka poslata za mikrobiološku obradu, onda mali deo od oba treba razmazati po pločici.

Bojenje po Gram-u

Primenjuje se standardno bojenje po Gramu koje prikazuje oblike *H. pylori* počev od kratkih štapića, do zakrivljenih štapića i kadkada spirala oblika slova S.

Kultivacija

Priprema inokuluma i inokulacija na agar ploče

1. Uzeti bioptat iz transportnog medijuma pomoću sterilne pincete i stavite ga u 0.5 ml NaCl ili u transportnu tečnu podlogu.
2. Zasejavanje bioptata vrši se na jednu selektivnu i jednu neselektivnu podlogu. Uzorak zasejati po celoj površini ploče, bilo pomoću žičane omčaste eze, sterilnog staklenog štapića sa zakrivljenim krajem ili Pasteur-ove pipete sa zakrivljenim krajem.

U lonac staviti kit za stvaranje gasa prema upustvu proizvođača.

Dužina inkubacije i održavanje mikroaerobne atmosfere

Održavanje odgovarajuće atmosfere,se postiže menjanjem kesica na svaka dva dana. ili prilikom svakog otvaranja lonca. Za primarnu izolaciju neophodno je inkubirati ploče na 37°C do 7 dana. Medjutim, ukoliko se kultivacijom potvrđuje uspešnost primenjene terapije, onda je neophodno ploče inkubirati 10 dana. Ploče se pregledaju prvi put nakon dva ili tri dana, a onda svakodneвно. Izolati *H. pylori* ne smeju biti ostavljeni na vazduhu duže od 45min.

Identifikacija *H. pylori*

Kolonije *H. pylori* su male (2mm) i prozračne. Bojenje po Gram-u pokazuje Gram negativne savijene bacile. Testovi oksidaze, katalaze i ureaze su pozitivni.

Test ureaze

Ureazna aktivnost *H. pylori* detektuje se inokulacijom pune eze kulture u 0.25ml urea bujon i inkubacijom na 37°C u vodeno kupatilo. Pojava crvene boje unutar nekoliko minuta označava pozitivnu reakciju.

Subkultivacija *H. pylori*

Subkultivacija pojedinačnih kolonija *H. pylori* je zahtevna procedura, a postiže se ukoliko se jedna kolonija subkultiviše na polje u prečniku od samo jednog cm. Nakon inkubacije od 2-3dana, porast treba razvući preko većeg dela podloge.

Čuvanje *H. pylori* izolata

1. Liofilizacija: koristi se sveži izolat (2-3dana).
2. U tečnom azotu: BHI bujon sa dodatkom 20% glicerol-a sačuvaće kulture duže od 6 meseci.
3. BHI bujon sa 10% glicerolom. *H. pylori* ostaje vijabilan nekoliko meseci ukoliko se uzorci bioptata zamrznu na -70°C.
4. Na -70°C: 1ml 1% peptonske vode i 25% glicerol se inokuliše svežom kulturom *H. pylori* i čuva se na -70°C. Ovakav način sačuvaće *H. pylori* najmanje jednu godinu.
5. Na polučvrstoj podlozi na 37°C: BHI agar 0.17% sa dodatkom 10% konjskog seruma i 0.25% ekstrakta kvasca inokulira se sveže poraslim kolonijama *H. pylori*. Ova polučvrsta podloga ostavi se u CO₂ inkubator na 37°C sa 98% vlažnošću. Kulture se subkultivišu mesečno na istu podlogu. Vlažnost treba održavati na 95%-98%; S obzirom da ova vlažnosr pogoduje razvoju gljivica, inkubator se mora redovno čistiti antifungalnim sredstvima.

In vitro testovi osetljivosti

Kontrola kvaliteta obavlja se s referentnim sojem *H. pylori* ATCC 43504.

Ispitivanje osetljivosti vrši se disk difuzionim metodom ili E –testom. Testiranje se može vršiti na sledeće antibiotike: Metronidazole, Levofloxacin, Tetracycline, Clarithromycin, Amoxicillin i Rifabutin