




## СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК

Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“  
Референтна лабораторија за *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*

### *Одржавање бактеријских култура за контролу квалитета*

Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
I	1/8	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_F

	<b>СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК</b>				
	Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ Референтна лабораторија за <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>				
<b>Одржавање бактеријских култура за контролу квалитета</b>					
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
	I	01/12/2023	2/8	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_QK

## СТАТУС ДОКУМЕНТА

Документ је препорука Референтне лабораторије за *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* (даље НРЛ) и нема статус националног водича добре лабораторијске праксе.

Стандардни оперативни поступак су написали стручњаци из НРЛ користећи референтну литературу из предметне области и узимајући у обзир капацитете и потребе микробиолошких лабораторија садржаних у извештају „Мапирање и евалуација националних капацитета за детекцију и карактеризацију хуманих *Salmonella* у локалним и регионалним лабораторијама у Републици Србији“ из септембра 2023. Намена документа је стандардизација свих фаза лабораторијског испитивања у оквиру микробиолошке дијагностике узрочника заразних болести из домена референтности НРЛ.


Документ није обавезујући али предлажемо имплементирање и поштовање СОП док се не објаве национални водичи добре лабораторијске праксе из области микробиологије.

## ЗАКОНСКИ ОСНОВ

Према Закону о заштити становништва од заразних болести („Сл. гласник РС“ бр. 15/16, 68/20 и 136/20) обавезно је спровођење епидемиолошког надзора и примене мера за спречавање и сузбијање заразних болести из домена референтности које се преносе храном, водом и животној средином (салмонелоза, трбушни тифус, паратифус, јерсиниоза, шигелоза, колера). У свим случајевима појаве или сумње на појаву заразне болести према чл. 21. Закона обавезно је лабораторијско испитивање ради утврђивања и типизације узрочника.

Да би се обезбедила тачност и репродуцибилност резултата лабораторијског тестирања у оквиру дијагностике и карактеризације цревних патогених бактерија је неопходна континуирана примена метода интерне контроле квалитета и повремена, најмање једном годишње, спољна контрола квалитета од стране регистроване агенције или националне референтне лабораторије.

У ту сврху је потребно да лабораторијско особље буде обучено за спровођење контроле квалитета, а предуслов је познавање и овладавање вештинама правилног руковања и одржавања бактеријских култура у лабораторијским колекцијама са пратећом документацијом.

	<b>СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК</b>				
	Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ Референтна лабораторија за <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>				
<b>Одржавање бактеријских култура за контролу квалитета</b>					
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
	I	01/12/2023	3/8	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_QK

## 1. Наслов

### *Одржавање бактеријских култура за контролу квалитета*

## 2. Предмет

СОП описује процедуру правилног руковања, одржавања, чувања (конзервације) и вођења записа о референтним културама и из њих изведених облика који се користе за контролу квалитета метода у дијагностици и карактеризацији *Salmonella*.

Неправилно чување и понављано субкултивисање референтних култура може изазвати промене микроорганизама, што је изнимно важно уколико се појаве измењени резултати код испитивања осетљивости микроорганизама на антимикуробне агенсе.

Дефиниције појмова:

**А) Референтна култура** је микроорганизам у конзервираном облику (лиофилизат) у регистрованим колекцијама култура (нпр. АТСС, ССМ, NCTC итд.). Конзервирани облик није у стадијуму раста док се не раствори и размножи први пут. Купљене референтне културе су  $\leq 3$  преноса „удаљене“ од оригинала у датој колекцији.

**Б) Референтна шток култура** је залиха култура добијена у лабораторији умножавањем конзервираног облика референтне културе. Чува се у лабораторији у конзервираном облику најчешће у замрзнутом стању (температура  $-70^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ , течном азоту) или ретко лиофилизираном облику.

**Ц) Радна шток култура** је залиха култура добијена субкултивацијом референтне шток културе. Чува се у лабораторији у замрзнутом стању и за рад најчешће на укошеном хранљивом агару у епрувети са навојем у фрижидеру до месец дана.


**Д) Субкултура (пасажа)** је пренос порасле радне шток културе на свежу подлогу, најчешће крвни агар. Раст референтне културе или референтне шток културе из конзервираног облика није субкултура.

## Скраћенице и дефиниције

АТСС	American Type Culture Collection
ССМ	Czech Collection of Microorganisms
IVD	<i>in vitro</i> медицинско средство
NCTC	National Culture Type Collection
РГ	ризична група микроорганизама или група биолошке штетности

## 3. Безбедно руковање

При раду је обавезно придржавање мера за безбедан рад које важе за лабораторију нивоа 2 биолошког изоловања. Употребљени материјал разврстан према врсти, одлагати у за

	<b>СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК</b>				
	Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ Референтна лабораторија за <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>				
<b>Одржавање бактеријских култура за контролу квалитета</b>					
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
	I	01/12/2023	4/8	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_QK

то предвиђене контејнере за стерилизацију инфективног отпада. *Salmonella* spp. припадају микроорганизмима РГ 2 осим *S. Typhi* која је РГ 3\*.

#### 4. Подлоге, реагенси

- Хранљиви агар (НА) укошен
  - 12-18% концентрација агара у подлози
  - рН~7.0 после стерилизације
- 5% крви агар (КА)
- Триптон соја бујон + 15% глицерола или Luria Bertani бујон (LB) + 15% глицерола
- 0.85% NaCl (FR)
- референтне културе микроорганизама

#### 5. Опрема и потрошни материјал


- Инкубатор за аеробну култивацију на 35±1 °С
- Замрзивач за ултра ниске температуре
- Фрижидер са комором за замрзавање
- Стерилне езе
- Аутоматска пипета
- Стерилни наставци 1000 µL (плави)
- Епрувете за замрзавање
  - 2 ml
  - аутоклавабилне
  - затварач са навојем
- Кутија за складиштење епрувета за замрзавање
  - величина 9x9 места или 10x10
  - аутоклавабилне
- Фломастер за обележавање епрувета за замрзавање
- Налепнице за поклопце епрувета за замрзавање
- Сталак за држање епрувета за замрзавање на радној површини
- Стерилни брисеви
- Стерилне езе
- Рукавице

#### 6. Процедура

##### А) Реконституција референтне културе

##### 1. дан

- По пријему сертифициване референтне културе у лабораторију обавезно сачинити запис нпр. „Картон *Esherichia coli* ATCC 25922“ и придружити му сертификат о анализи који мора бити достављен од стране произвођача

	<b>СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК</b>				
	Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ Референтна лабораторија за <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>				
<b>Одржавање бактеријских култура за контролу квалитета</b>					
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
	I	01/12/2023	5/8	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_QK

- У картон уписати датум пријема, назив и ознаку културе, произвођача, серију и рок употребе
- Реконституцију вршити по упутству произвођача у безбедном окружењу (биосигурносна комора), видети препоруку <https://www.eurl-ar.eu/eqas.aspx>
- Обзиром да се најчешће продаје као лиофилизат неопходно је у ампулу са прахом рехидрирати и поступити према упутству за даљу култивацију на 4 КА, преконоћно инкубарати у инкубатору за аеробну култивацију на 35±1 °С.

## 2. дан

- После инкубације на сваку плочу КА додати по 4 mL бујона-глицерол
- Са сваке плоче КА инокулисати езом нове 4 плоче КА у циљу провере чистоће културе
- Са плоча пренети по 1 mL инокулума у 11 епрувета за замрзавање
- Обележити епрувете бројевима (1-4) према плочи са које су инокулисане
- Преконоћно инкубирати плоче КА и епрувете

## Б) Добијање референтног и радног штока култура


### 3. дан

- Уколико се сутрадан уочи да култура није чиста на некој плочи, елиминисати припадајуће епрувете и поновити поступак
- Уколико је култура чиста наставити поступак тако што две епрувете означити као „Реф“ - референтне културе, обележити **црвеном бојом** и замрзнути.
- Препоручује се замрзавање и чување на ултраниској температури ≤ -70 °С
- Она ће служити за добијање нове серије „Референтна шток култура“
- Преосталих 9 епрувета означити као „Радна шток култура“, обележити **плавом бојом** и замрзнути. Служи за добијање радне субкултуре или пасажа
- Препоручује се замрзавање и чување на ултраниској температури ≤ -70 °С
- Резултате контроле увести у картон

## В) Добијање радних култура и пасажа

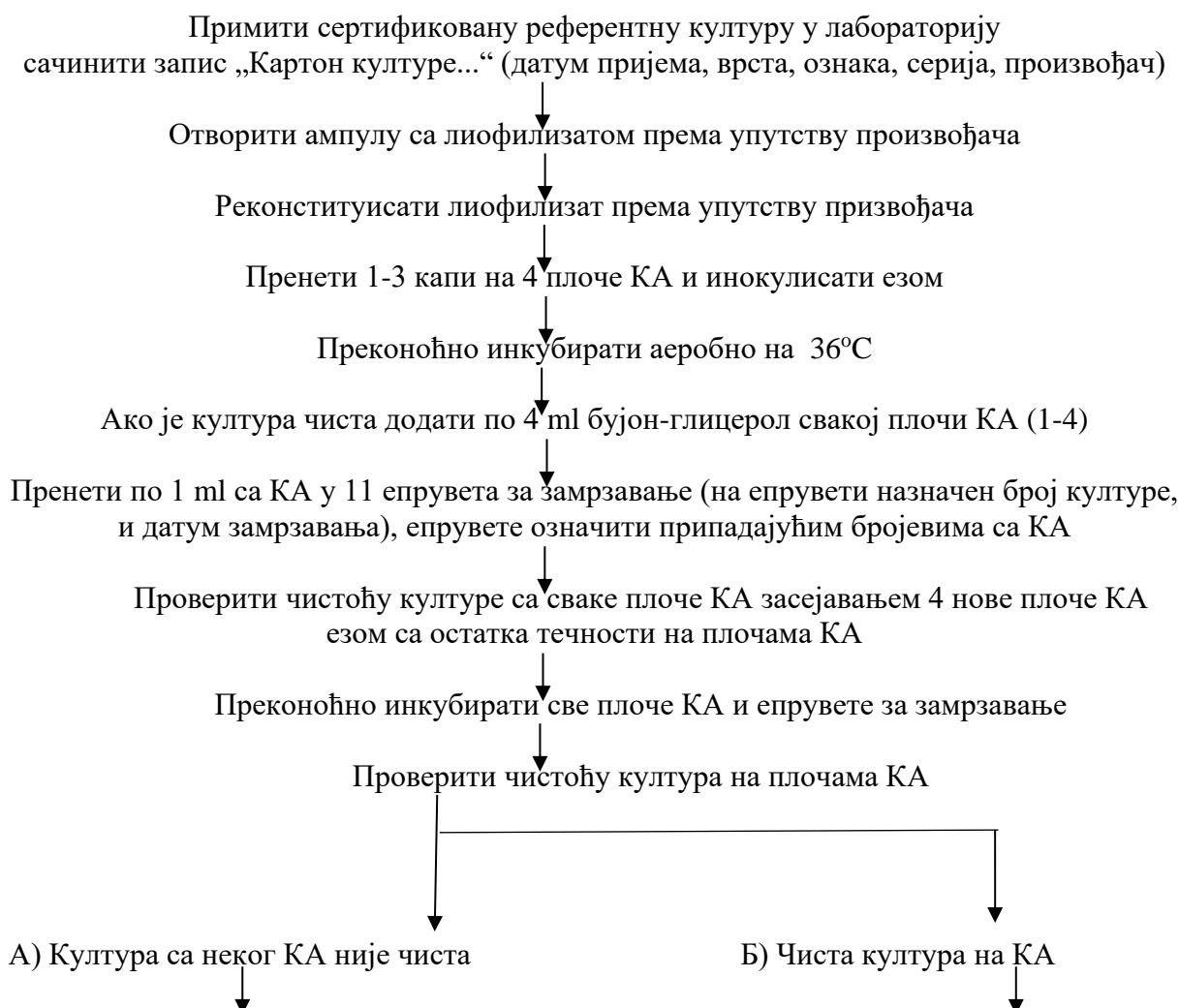
### 4. дан


- **Радне субкултуре се добијају размножавањем културе из „ плаве епрувете“ (1-9)**
- Извадити плаву епрувету (бр. 1) и ставити у сталак за епрувете за замрзавање
- Одврнути поклопац и езом загребати мало по површини замрзнуте подлоге
- Инокулисати плочу КА и преконоћно инкубирати
- Епрувету бр 1. вратити у замрзнутом стању на припадајуће место
- Обележити плочу КА као радну културу (ознака културе, датум, име техничара који је радио) и користити је за рад у наредних 5 дана
- Субкултивисати на укошени НА у епрувети са навојем за добијање пасажа на КА у току наредних месец дана, КА- пасажа која ће се користити у току седмице
- У „картону“ регистровати да је направљена радна култура (датум, име и презиме техничара)

	<b>СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК</b>				
	Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ Референтна лабораторија за <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>				
<b>Одржавање бактеријских култура за контролу квалитета</b>					
Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:	
I	01/12/2023	6/8	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_QK	

- Када почне употреба последње 9. плаве епрувете, треба субкултивисати црвену епрувету „Реф“ на 4 плоче КА и поновити поступак претходно описан
  - Са 4 КА умножити нову серију плавих „Реф радне“ са 9 епрувета
  - Проверити чистоћу културе
  - Црвену „Реф“ епрувету вратити на место у замрзивачу
- Замрзнута „Реф“ референтна култура може бити субкултивисана највише 4 пута (укупно 5 пасажа из АТСС оригиналне културе) да би био сачуван АТСС-број
- Изузетно је важно у „Картон“ уписивати сваки број пасажа „Реф“ културе са датумом
- Пре него се потроше обе црвене „Реф“ епрувете растворити нову лиофилизовану гранулу односно купити нову културу
- Уколико лабораторија не поседује замрзивач са ултраниским температурама користити комору за замрзавање у фрижидеру

#### *Алгоритам 1. Реконституција и конзервација референтне културе*



	<b>СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК</b> Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ Референтна лабораторија за <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>				
	<b>Одржавање бактеријских култура за контролу квалитета</b>				
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
	I	01/12/2023	7/8	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_QK

Одбацити све припадајуће епрувете са те плоче      Замрзнути 2 црвене и 9 плавих епр.

↓

Забележити у картону резултате контроле      субкултура (пасажа) КА + НА

↓


Поновити поступак      субкултура (пасажа) КА

### 3. Веза са документом

1. СОП\_Диск дифузиони тест за испитивање осетљивости *Salmonella* на антимикуробне агенсе
2. СОП\_Биохемијска идентификација *Salmonella enterica*
3. СОП\_Бактериолошки преглед столице на *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*

### 4. Референце

1. Правиник 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/CustomData/Files/Folders/25-resourcer/329\\_handlingreferencestrains-dec2012-6.pdf](https://www.eurl-ar.eu/CustomData/Files/Folders/25-resourcer/329_handlingreferencestrains-dec2012-6.pdf)

	<b>СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК</b>				
	Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ Референтна лабораторија за <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>				
<b>Одржавање бактеријских култура за контролу квалитета</b>					
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
	I	01/12/2023	8/8	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_QK

Прилог 1. Пример картона контролне културе

<b>Назив</b> <i>Escherichia coli</i>	<b>Ознака</b> ATCC 25922	<b>Лабораторијски код у колекцији</b> EC1			
<b>Произвођач</b> Microbiologics USA	<b>Облик</b> Лиофилизат (Kwick stick)	<b>Серија</b>	<b>Рок употребе</b> Датум		
<b>Сврха</b> Контрола антибиограма Christensen уреа агар; Simmons цитрат агар; ONPG...	<b>Реконституција</b> Датум	<b>Референтни шток (2 ком)</b> Датум Датум Датум Датум...	<b>Шток радних култура (9 ком)</b> Датум Датум Датум Датум...		
<b>Месечни депозит ултраниска темп.</b>	<b>Месечни депозит 2-8°C</b>	<b>Датум пасаже</b>	<b>Одговоран техничар</b>		
Јануар					
Фебруар					
Март					
Април					
Мај					
Јун					
Јул					
Август					
Септембар					
Октобар					
Новембар					
Децембар					