




## СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК

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

### ***Бактериолошки преглед столице за *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp.***

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><i>Бактериолошки преглед столице за Salmonella spp., Shigella spp., Campylobacter spp.</i></b>					
	Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
	I	2/8	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_KK

## СТАТУС ДОКУМЕНТА

Документ је препорука Референтне лабораторије за *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* (даље НРЛ) и није одобрен од стране Министарства здравља.

Стандардни оперативни поступак су написали стручњаци из НРЛ користећи референтну литературу из предметне области 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“. Намена документа је стандардизација свих фаза лабораторијског испитивања у оквиру микробиолошке дијагностике узрочника заразних болести из домена референтности НРЛ.

Документ није обавезујући, предлаже се имплементирање и поштовање СОП док се не објаве национални водичи добре лабораторијске праксе из области медицинске 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 примена мера за спречавање и сузбијање заразних болести из домена референтности а које се преносе храном, водом и животном средином (салмонелоза, трбушни тифус, паратифус, јерсиниоза, шигелоза, колера). Према члану 21. Закона обавезно је лабораторијско испитивање ради утврђивања и типизације узрочника у свим случајевима појаве или сумње на појаву заразне болести.

Према Номенклатури здравствених лабораторијских услуга на примарном, секундарном и терцијарном нивоу („Сл. гласник РС“ бр. 70/19, област VI– микробиолошке анализе, услуге из бактериологије) лабораторијска услуга „**Бактериолошки преглед столице за *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* и *Campylobacter spp.***“ обухвата:

- **култивисање испитиваног узорка столице (фецеса) на селективним и диференцијалним бактериолошким подлогама и**
- **одабир репрезентативних колонија за идентификацију рода/врсте наведених патогених цревних бактерија**

У важећем Правилнику о ценама лабораторијских здравствених услуга на примарном, секундарном и терцијарном нивоу („Сл. гласник РС“ бр. 132/21) наведена услуга је означена шифром L019331.

	<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><i>Бактериолошки преглед столице за Salmonella spp., Shigella spp., Campylobacter spp.</i></b>					
	Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
	I	3/8	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_KK

## 1. Наслов

***Бактериолошки преглед столице за Salmonella spp., Shigella spp. и Campylobacter spp.***

## 2. Предмет

СОП описује бактериолошки преглед узорка столице или ректалног бриса у циљу откривања *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp. (синоним копрокултура) методом засејавања узорка на бактериолошке подлоге.

На резултат тестирања и изолацију наведених узрочника утичу бројни фактори: претходна антимикуробна терапија, интермитентно излучивање узрочника у столицу, мали број узрочника у односу на цревни микробиом, дуготрајни транспорт узорка. Ови фактори условљавају примену методе селективног обогаћења узорка и употребу селективних и диференцијалних бактериолошких подлога.

У овом СОП селективне и диференцијалне подлоге ће бити наведене као „селективне подлоге“

## 3. Скраћенице и дефиниције


ATCC	American Type Culture Collection
CFU	Colony forming units
РГ	Ризична група микроорганизама или група биолошке штетности

## 4. Безбедно руковање

При раду је обавезно придржавање мера за безбедан рад које важе за за лабораторију нивоа 2 биолошког изоловања. Употребљени материјал разврстан према врсти одлагати у за то предвиђене контејнере за стерилизацију инфективног отпада.

## 5. Подлоге, реагенси

- XLD агар (ксилоза-лизин-дезоксихолат агар)
- MacConkey агар
- CCDA агар за *Campylobacter* spp. (цефоперазон деоксихолат агар са активним угљем)
- Селенит цистин или селенит Ф бујон (10 ml)
- Физиолошки раствор рН=7.2 - 7.4 (ФР)
- ХА (укошени хранљиви агар)
- COL агар (Columbia агар са 5% овчје крви)
- Културе микроорганизама за контролу квалитета подлога

	<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>Бактериолошки преглед столице за <i>Salmonella spp.</i>, <i>Shigella spp.</i>, <i>Campylobacter spp.</i></b>					
	Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
	I	4/8	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_KK

## 6. Опрема и потрошни материјал

- Инкубатор за аеробну култивацију 36±1 °C
- Инкубатор за микроаерофилну култивацију 42±1 °C
- Лонац (и) за микроаерофилну инкубацију
- Апарат за одређивање густине бактеријске суспензије/ дензимат
- Комерцијалне кесице за продукцију гасова за микроаерофилни *Campylobacter spp.*
- Стерилни брисеви
- Стерилне езе  $\varnothing$  1  $\mu$ L и 10  $\mu$ L
- Рукавице

## 7. Процедура


### Преаналитичка фаза испитивања

- Провера следљивости узорка и пропратног упута за испитивање

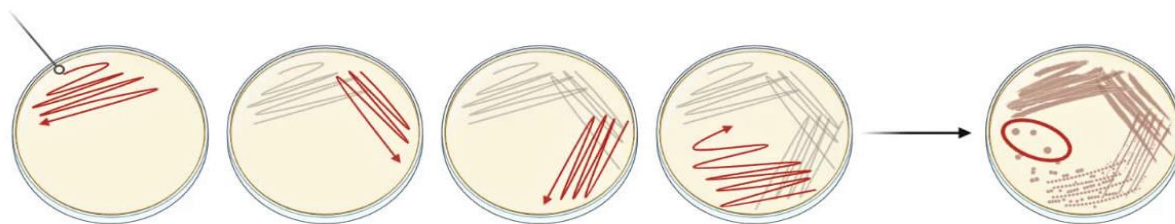
### Аналитичка фаза испитивања

#### A. Обрада и култивација узорка „директно засејавање и селективно обогаћење“

- Проверити исправност подлоге (одсуство дефеката, контаминација, адекватна дебљина, влажност)
- Поштовати правила засејавања „Један узорак – једна плоча“ методом исцрпљивања узорка у циљу добијања појединачних колонија (Слика 1)
- Уколико је узорак формиран у бочицу са фецесом налити 1-2 ml ФР и емулговати штапићем па га одбацити
- Брисем узорковати фецес нарочито слуз или крв уколико су присутни и инокулисати један квадрант плоче MacConkey, XLD, CCDA
- Езом развући инокулум преко целе подлоге методом исцрпљивања
- Други брис уронити у узорак и ресуспендовати у селенит бујон, брис може остати у бујону или га бацити. Количина узорка на брису не треба да буде велика како не би дошло до прерастања цревне флоре после субкултивације
- Уколико је узорак ректални брис један искористити за засејавање чврстих подлога а други уронити у селенит бујон
- Инокулисане подлоге XLD и MacConkey са поклопцем окренутим надоле (не више од 5 плоча у стубу) и селенит бујон инкубирати аеробно преко ноћно 18-24 часова
- Инокулисану селективну подлогу за *Campylobacter spp.* ставити у лонац, а непосредно пре затварања лонца уложити отворену кесицу за продукцију гасова за микроаерофилне микроорганизме и инкубирати 48 часова

	<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>Бактериолошки преглед столица за <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp.</b>				
Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:	
I	5/8	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_KK	

- После преконоћне инкубације извршити субкултивацију бујона езом 10 µL са површине на XLD секундарни методом исцрпљивања и инкубирати преконоћно аеробно. Не мућкати бујон!
- Инспекција пораслих култура на инкубираним чврстим подлогама



Слика 1. Култивација методом „исцрпљивања“

## Б. Инспекција пораслих култура

Очекивани изглед колонија *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*


MacConkey агар: *Salmonella* и *Shigella* формирају безбојне провидне колоније 2-4 mm (*Salmonella*) односно 2-3 mm (*Shigella*) јер су лактоза-негативне, у односу на већину розе колоније (лактоза-позитивне); *S. sonnei* обично формира колоније (3-4 mm) неравне површине

XLD агар: *Salmonella* типично формира светло розе или провидне колоније са црним центром. Колоније *S. Typhi* могу бити и без црног центра, а *S. Paratyphi A* су типично без црног центра. *Shigella* формира безбојне, глатке провидне колоније 1-2 mm, осим *S. sonnei* која формира мутније и веће колоније

CCDA агар: сиве, воштане или бутерасте, метални сјај, сливене или појединачне колоније *Campylobacter*

Инспекција култура након преконоћне инкубације, 18-20 часова:

1. MacConkey – раст и однос лактоза-позитивне ЛП+ : лактоза-негативне ЛН-, и упоредити са изгледом културе на XLD
  2. XLD – присуство сумњивих колонија *Salmonella* и *Shigella*; ако су све колоније жуте/наранџасте без или са црним центром не треба их додатно тестирати
- Ако су сумњиве колоније уочене на обе подлоге, довољно је субкултивисати до три суспектне колоније са XLD на неселективни ХА за бихемијску идентификацију. Субкултивација на неселективну подлогу није обавезујућа због скраћивања периода издавања резултата
  - Некада се користи, али се не препоручује, коришћење *Salmonella* поливалентног-О серум за аглутинацију сумњивих колонија (скрининг). Међутим, због честе О-

	<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>Бактериолошки преглед столица за <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp.</b>				
Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:	
I	6/8	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_KK	

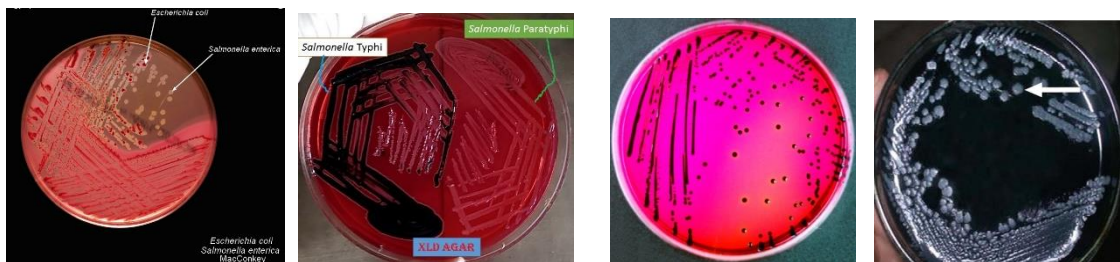
антигенске укрштене реактивности *Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter* & *Hafnia* при појави аглутинације обавезна је биохемијска идентификација

Инспекција култура након другог дана инкубације, после 48 часова

1. CCDA – сумњиве колоније за *Campylobacter* одабрати за микроскопски препарат; ако се уоче карактеристични Грам-негативни *Campylobacter* бацили субкултивисати културу на COL агар за преконоћну инкубацију у микроаерофилним условима за оксидаза и каталаза тестирање и слање у НРЛ за *Campylobacter* на идентификацију
2. XLD секундарни – одабрати најмање по једну сумњиву колонију за биохемијску идентификацију *Salmonella*, изнимно *Shigella* „преживи“ селенит па ретко расте на сек. XLD
3. Ако су све колоније жуте/наранџасте без или са црним центром не треба их додатно тестирати
4. Изузетно је редак раст колонија *Shigella* после селективног обогаћења



Слика лево: *Shigella* на MacConkey, Слика средина: *Shigella* на XLD, Слика десно: *S. sonnei* на XLD



Слика крајње лево: *S. enterica* на MacConkey

Слика лево: *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* на XLD


Слика десно: NTS (нетифоидна *Salmonella*) на XLD

Слика крајње десно: *Campylobacter* на CCDA

### Постаналитичка фаза испитивања

- Извештавање резултата је могуће минимално после 48 часова након пријема узорка у лабораторију за негативан резултат испитивања: „Нису изоловане бактерије из рода *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*“
- Резултат се не сме издавати на основу изгледа сумњивих колонија на селективним подлогама. Обавезна је биохемијска идентификација




	<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>Бактериолошки преглед столица за <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp.</b>					
	Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
	I	7/8	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_KK

- Извештавање позитивног резултата није могуће пре 48 односно 72 часа од пријема узорка због неопходности биохемијске дентификације узрочника и пожељне прелиминарне серолошке типизације *Salmonella* и *Shigella*
- Извештавање термотолерантни *Campylobacter* spp.
- Обавезно је пријављивање сва три узрочника надлежном заводу за јавно здравље у циљу надзора

## 8. Контрола квалитета

- Односи се на све три селективне подлоге; контрола хранљивости и селективности
- Свака нова серија, било готове комерцијалне подлоге или *in house* направљене подлоге
- Контролни микроорганизми са типчним особинама или *in house* културе
  - *S. Enteritidis* ATCC 13076
  - *S. flexneri* 2b ATCC 12022
  - *S. sonnei* ATCC 25931
  - *Campylobacter jejuni* ATCC 33291
  - *Escherichia coli* ATCC 25922
  - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Контрола хранљивости* (*S. Enteritidis*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *Campylobacter jejuni*)
  - ✓ Направити суспензију контролног микроорганизма густине 0.5 McFarland (~1-2x10<sup>8</sup> cfu/ml)
  - ✓ Суспензију разредити у односу 1:100 у ФР (1-2x10<sup>6</sup> cfu/mL)
  - ✓ Вортексирати суспензију
  - ✓ 1μL суспензије езом инокулисати на подлогу методом исцрпљивања
  - ✓ Разређење не бацати док се не очита резултат тестирања!
  - ✓ Инкубирати подлоге у условима зависно од врсте контролног микроорганизма
  - ✓ Уколико порасту сливене колоније, поновити поступак са разређењем 1:1000 тј. постојеће разређење дилутирати 1:10 и инокулисати подлогу езом 1μL
  - ✓ У картон контроле подлоге уписати резултат контроле (број колонија, очекиван и добијен изглед колонија)
- *Контрола селективности* (*E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212)
  - ✓ Направити суспензију контролног микроорганизма густине 0.5 McFarland
  - ✓ Суспензију разредити у односу 1:10 у ФР
  - ✓ Вортексирати суспензију
  - ✓ 1μL суспензије инокулисати на подлогу методом исцрпљивања
  - ✓ Инкубација у одговарајућим условима зависно од врсте контролног микроорганизма

	<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>Бактериолошки преглед столице за <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp.</b>					
	Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
	I	8/8	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_KK

- ✓ Очекиван резултат је одсутан раст *E. faecalis*, а раст *E. coli* инхибисан у мањој или већој мери зависно од врсте подлоге
- ✓ У картон контроле подлоге уписати резултат контроле (број колонија, изглед)

## 9. Укрштање са другим поступцима

- СОП\_Узимање узорка столице и ректалног бриса
- СОП\_Биохемијска идентификација *Salmonella*
- СОП\_Биохемијска идентификација *Shigella*
- СОП\_Одржавање бактеријских култура за контролу квалитета

## 10. 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. B. Isenberg, Henry D., editor. 2004. Clinical Microbiology Procedures Handbook, American Society for Microbiology, Washington DC.
4. WHO network building capacity to detect, control and prevent foodborne and other enteric infections from farm to table ” Laboratory Protocol: “Isolation of *Salmonella* and *Shigella* from Faecal Specimens”. WHO Global Foodborne Infections Network. November 2010. [https://antimicrobialresistance.dk/CustomerData/Files/Folders/6-pdf-protocols/62\\_gfn-stool-culture-nov2010.pdf](https://antimicrobialresistance.dk/CustomerData/Files/Folders/6-pdf-protocols/62_gfn-stool-culture-nov2010.pdf)