




СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК

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

Биохемијска идентификација Salmonella enterica subsp. enterica

Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
I	1//13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_F

	СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК				
	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>				
Биохемијска идентификација <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>					
	Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
	I	2/13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_BHSa

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 које се преносе храном, водом и животном средином (салмонелоза, трбушни тифус, паратифус, јерсениоза, 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 „**Биохемијска идентификација *Salmonella enterica* subsp. *enterica*“ обухвата идентификацију врсте испитивањем физиолошко-биохемијских особина.**

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 L019945.

	СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК				
	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>				
Биохемијска идентификација <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>					
	Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
	I	3/13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_BH5a

1. Наслов

Биохемијска идентификација *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

2. Предмет

СОП описује биохемијску идентификацију *Salmonella enterica* subsp. *enterica* хуманог порекла применом кратког панела тестова који се могу припремати у лабораторији или су комерцијално доступни.

Род *Salmonella* припада фамилији *Enterobacteriaceae* са више од 2600 антигенски различитих серотипова сврстаних у две биохемијски различите врсте *S. enterica* и *S. bongori* односно 6 подврста:

1. *Salmonella enterica* subsp.:
 - i. *enterica* (I)
 - ii. *salamae* (II)
 - iii. *arizonae* (IIIa)
 - iv. *diarizonae* (IIIb)
 - v. *houtenae* (IV)
 - vi. *indica* (VI)
2. *Salmonella bongori* (бивша подврста V)

Идентификација врсте и подврсте *Salmonella* spp. се врши на основу физиолошко-биохемијских особина, а идентификација серотипа на основу детектованих соматских-О флагеларних-Н антигена методом серотипизације на стаклу.


S. enterica је после *Campylobacter* најчешћи узрочник инфекција који се преноси храном. Грам-негативни бацили, факултативно анаеробни, оксидаза-негативни, ферментују глукозу уз продукцију киселине и гаса, не ферментују лактозу, најчешће покретни захваљујући флагелама (ретки изузеци *S. Gallinarum*). Стварају значајну количину H₂S изузев *S. Typhi* (5% H₂S+) и *S. Paratyphi A* (8% H₂S+).

3. Скраћенице

ATCC American type Collection
РГ Ризична група микроорганизама илли група биолошке штетности

4. 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 то предвиђене контејнере за стерилизацију инфективног отпада. *Salmonella* spp. припадају микроорганизмима РГ2 осим *S. Typhi* која је РГ3*.

	СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК				
	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>				
Биохемијска идентификација <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>					
	Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
	I	4/13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_BH5a

5. Подлоге, реагенси

- ONPG реагенс (*o*-nitrophenyl β -D-galactopyranosid)
 - нестабилан, осетљив на светлост
 - раствор у 0.85% NaCl, чувати аликвотиран 0.3ml на температури ≤ -10 °C
- Оксидаза реагенс или дискови (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenyldiamine dihydrochloride)
 - осетљив на светлост
- TSI агар (Троструки шећер) или KIA агар (Клиглер, двоструки шећер)
 - укошен
 - дубина 2.0-2.5 cm
- Уреа агар (Christensen)
 - укошен
 - дуга косина, ниска дубина
 - pH 6.8
 - уреа се не сме аутоклавирати већ се додаје стерилисаној подлози, претходно се стерилише филтрацијом
- LIA агар или LDC бујон (Лизин агар или лизин-декарбоксилаза бујон)
 - LIA агар је супериоран у односу на бујон јер детектује и гас H₂S
 - укошен агар (дубина = 3 cm) или бујон (4-5 ml подлоге)
- Цитрат агар (Simmons)
 - укошени агар
- СИМ агар (сулфид-индол-покретљивост) или 0.5% агар за покретљивост
 - опционо
 - Ковачев реагенс уз СИМ агар за детекцију индола
- 0.85% NaCl
- Културе микроорганизама за контролу квалитета


6. Опрема и потрошни материјал

- Инкубатор за аеробну култивацију 36 \pm 1 °C
- Фрижидер са замрзивачем
- Стерилно минерално уље
- Стерилне езе 10 μ L, 1 μ L, убудне игле
- Стерилни брисеви
- Рукавице

7. Процедура са контролом квалитета

А) ONPG тест

Користи се за диференцирање ентеробактерија на основу β D галактозидазне активности. Способност бактерија да користи лактозу зависи од ензима пермеазе и β галактозидазе. Пермеаза омогућава пролаз лактозе у бактерију у којој се цепа на глукозу и галактозу

	СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК 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>				
	Биохемијска идентификација <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>				
Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:	
I	5/13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_BH5a	

захваљујући другом ензиму β галактозидази. Ензими су индуцибилни и стварају се само када је лактоза доступна бактерији. Неке бактерије немају пермеазу па су лактоза-негативне или споро лактоза-позитивне.

ONPG је безбојна супстанца, структурно слична лактози, и у овом тесту се користи као супстрат за β галактозидазу. ONPG тест диференцира „типичне“ лактоза-негативне који имају β галактозидазу а немају пермеазу. Тест ферментације лактозе не детектује бактерије без пермеазе те га не треба користити као замену за ONPG тест. Ако тестирани изолат поседује β галактозидазу, раскинуће β галактозидазну везу ослобађајући галактозу и *o*-нитропхенол жуте боје (реакција се читава као позитивна). Активност галактозидазе је појачана у присуству соли натријума па се реагенс раствара у 0.85 NaCl %.

Контрола квалитета

Escherichia coli ATCC 25922 (ONPG тест позитиван)

Salmonella Enteritidis ATCC 13076 (ONPG тест негативан)

Salmonella enterica subsp. IIIa (ONPG тест позитиван)

Salmonella enterica subsp. III b (ONPG тест позитиван)


- Реагенс извадити из замрзивача и сачекати да се отопи на собној температури
- Преконтролисати исправност реагенса, не користити уколико је замућен, жућкаст или са талогом
- Ресуспендовати испитивану културу /колонију (може и са селективне подлоге)
- Инкубирати 1 час на 36 ± 1 °C
- Ако се појавила жута боја тест је позитиван, забележити резултат и тест завршити.
- Ако је тест негативан инкубацију продужити на два часа, очитати, наставити инкубацију, очитати после 4 часа
- Ако је негативан оставити преконоћно у инкубатору и очитати реакцију ујутро



Left to Right:
ONPG negative
ONPG positive

Б) Тест коришћења шећера (TSI или Kligler агар)

Троструки шећер (TSI агар) је сложена подлога за идентификацију грам-негативних бацила; садржи 0.1% глукозу, 1% лактозу, 1% сахарозу, пептоне, фенол црвено као рН индикатор, фери и фери јоне и натријум тиосулфат за детекцију гаса H_2S .

	СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК				
	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>				
Биохемијска идентификација <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>					
	Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
	I	6/13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_BH5a

а) **Изглед TSI засејан лактоза-негативном културом (косина црвена/дубина жута):**
У току првих 8-12 часова инкубације ствара се мала количина киселине разлагањем глукозе и цела подлога постаје жута због киселе средине. Оксидативни метаболизам културе се наставља само на косини на рачун пептона, стварају се алкални амини и боја косине постаје црвена због алкалне средине након 18-24 часа инкубације. Пошто нема оксидативног разлагања пептона у дубини подлоге, дубина остаје жута.

б) **Изглед TSI засејан лактоза-позитивном културом и/или сахароза ферментујуће (косина жута/дубина жута):** После потрошене глукозе наставља се метаболисање лактозе и/или сахарозе зависно од ензимског система те се ствара велика количина киселине у целој подлози (рН кисео) те су и косина и дубина подлоге жуте. Оксидативно метаболисање пептона се такође одвија на косини али количина алкалних продуката није довољна да промени боју подлоге (евентуално на врху косине подлоге).

ц) **Код неферментативних грам-негативних бацила (косина црвена/дубина црвена):** Шећери се не метаболишу, нема стварања киселине, а оксидативно метаболисање постоји само на косини тако да цела подлога изгледа врло слично незасејаној (нијанса промене боје на косини интензивније црвена у односу на косину незасејане подлоге).

д) **Стварање гаса** метаболисањем шећера се огледа у виду мехурића у подлози који некада и цепају подлогу или је подижу навише.

е) **H₂S гас** се ствара из натријум тиосулфата, а детектује захваљујући редукцији фери јона у подлози због чега се формира црни преципитат у дубини подлоге. При упадној светлости се види жута дубина која у некад маскира велика клочина црног преципитата.

ф) Подлога није адекватна за испитивање покретљивости бактерија! За ту особину користити подлогу за покретљивост.

Двоструки шећер (Клиглер, KIA агар) се разликује од TSA само по томе што не садржи сахарозу, те су све реакције идентичне наведеним осим код сахаролитичних бактерија, које на овој подлози се не могу разликовати од лактоза-негативних. Користан је у дијагностици *Yersinia enterocolitica* и *Vibrio* spp.

Контрола квалитета

<i>E. coli</i> ATCC 25922:	TSI (косина/ дубина) жуто/жуто; гас; H ₂ S –
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	KIA (косина/ дубина) жуто/жуто; гас; H ₂ S –
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	TSI (косина/ дубина) црвено/жуто; ± гас; H ₂ S+
	KIA (косина/ дубина) црвено/жуто; ± гас; H ₂ S+
	TSI (косина/ дубина) црвено/црвено; без гаса
	KIA (косина/ дубина) црвено/црвено; без гаса

- Подлогу извадити из фрижидера и темперирати на собној температури



СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК

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

Биохемијска идентификација *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
I	7/13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_BH5a

- Преконтролисати изглед подлоге и одбацити ако не одговара (кратка дубина, контаминација, дефекти, сува подлога)
- Убости дубину подлоге до 3-5 mm близу дна
- Извући убудну иглу/езу из дубине и змијоликим покретима инокулисати целу површину косине подлоге
- Затворити епрувету лабавим металним/памучним затварачем
- Инкубирати преконоћно на 36 ± 1 °C
- Очитавати тест најкраће после 18 часова инкубације због могуће лажне киселе реакције на косини
- Регистровати промену боје у дубини и косини подлоге; мехуриће гаса и црни преципитат H_2S
- Тест не очитавати уколико је инкубација била дужа од 24 часа. Уколико је неопходно одложено очитавање, културу оставити у фрижидер на 2-8 °C

Табела 1 Изглед TSI и KIA агара

Косина	Дубина	H_2S^*	Бактеријске врсте
кисела/жута	кисела/жута	не	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp.
кисела/жута	кисела/жута	да	неки <i>Citrobacter</i> spp.
алкална /црвена	кисела/жута	не	<i>Shigella</i> spp., <i>Morganella</i> , <i>Citrobacter</i> spp.
алкална /црвена	кисела/жута	да	<i>Salmonella</i> spp., <i>Proteaeae</i> , <i>Citrobacter</i> spp.
алкална /црвена	алкална /црвена	не	Неферментори, <i>Pseudomonas</i> spp.
кисела/жута **	кисела/жута **	не	<i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Edwardsiella tarda</i>

* H_2S продукција: црни преципитат у дубини или само на линији засејавања; код *S. Typhi* црни брк на линији дубине и косине

** важи само за TSI (KIA: црвено/жуто)



A B C D E F

A: Uninoculated TSI

B: *Salmonella* serovar Typhi K/A^{TR} (Alkaline slant / Acid Butt / Trace H_2S / No Gas)

C: *Salmonella* serovar Newport K/A₃ *** (Alkaline slant / Copious H_2S / Gas)


D: *Shigella flexneri* K/A (Alkaline slant / Acid Butt / No H_2S / No Gas)

E: *E. coli* A/A (Acid slant / Acid Butt / No H_2S / Copious Gas)

F: *Pseudomonas aeruginosa* (Non-fermenter / No H_2S / No Gas)

Ц) Уреаза тест

Многе бактерије поседују ензим уреазу која разлаже уреу на амонијак и угљен диоксид продукујући амонијум карбонат алкални метаболит који мења боју индикатора Christensen urea агара из жуте у светло розе. Тест је важан у идентификацији *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. и *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori*

	СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК 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>				
	Биохемијска идентификација <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>				
Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:	
I	8/13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_BH5a	

Контрола квалитета

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 (уреаза тест позитиван)

S. Enteritidis ATCC 13076 (уреаза тест негативан)

- Уреа агар извадити из фрижидера и темперирати на собној температури
- Преконтролисати изглед подлоге и одбацити ако не одговара (кратка дубина, контаминација, дефекти, сува подлога)
- Змијоликим покретима инокулисати целу косину подлоге
- Затворити епрувету лабавим металним/памучним затварачем.
- Инкубирати преконоћно на 36 ± 1 °C
- Регистровати раст и промену боје на косини подлоге



A: Uninoculated Urea Agar
 B: Positive (*Proteus mirabilis*)
 C: Negative (*E. coli*)

A B C

Д) Тест декарбоксилације лизина (LIA агар или LDC бујон)


Подлога са лизином (или аргинином или орнитиним) се користи за тестирање ензимске способности бактерија да разлаже наведену аминокиселину при чему ствара алкалне аminerу у подлози. Најчешће се користи LIA укошени или дубоки агар а може и Møller бујон са лизином (LDC бујон). Тест се користи за диференцијацију родова *Salmonella* spp. (+), *Citrobacter* (-), *Proteus* spp. (-).

LIA укошени агар: на косини (аеробна средина) тестира се способност бактерије да врши деаминацију лизина ако посеује ензим LDA, а у дубини (анаеробна средина) врши декарбоксилацију лизина ако поседује ензим LDC.

Бактеријска култура ферментисањем глукозе у дубини ствара киселе продукте и подлога постаје жута у дубини. Уколико бактерија има и способност декарбоксилације лизина настали амини у дубини мењају киселу у алкалну средину што се види враћањем љубичасте оригиналне боје у дубини. Ако бактерија нема LDC ензим боја дубине остаје жута.

Боја косине остаје непромењено љубичаста код бактерија које немају ензим лизин-деаминазу (LDA-). Ако бактерија има тај ензим (LDA+) косина подлоге добија црвенкасто-смеђу боју јер се на косини формирају црвено-смеђи амински продукти под утицајем атмосферског O₂.

Гас H₂S се уочава попут преципитата услед формирања Fe-сулфида или потпуно пребојава дубину код бактерија које имају ту способност.

	СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК				
	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>				
Биохемијска идентификација <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>					
	Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
	I	9/13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_BH5a

Ако се користи лизин бујон омогућено је тестирање само способности деаминације лизина. Предуслов је површину сипати 2-3 капи парафинског уља после инокулације културе да би се обезбедили анаеробни услови за евентуалну декарбоксилацију лизина.

У LIA укошеном агару *Salmonella* (већина) у дубини стварају алкалне аminerе те постаје љубичаста; косина остаје оригинално љубичаста због одсуства ензима LDA. У дубини подлоге гас H₂S ствара црни преципитат. *Salmonella* су једина група ентеробактерија које брзо врше декарбоксилацију лизина (LDC+) и продукују H₂S (изузетак *S. Paratyphi A* LDC-негативан 100%).

LIA укошен агар: *Citrobacter freundii* - дубина жута/косина љубичаста јер нема LDC ни LDA ензиме; *Proteus*, *Providencia*, са изузетком неких *Morganella morganii* - дубина жута/косина црвена јер нема LDC али има ензим LDA који на косини формира црвено-смеђе аминске продукте.

Контрола квалитета


S. Enteritidis ATCC 13076 (лизин тест позитиван)

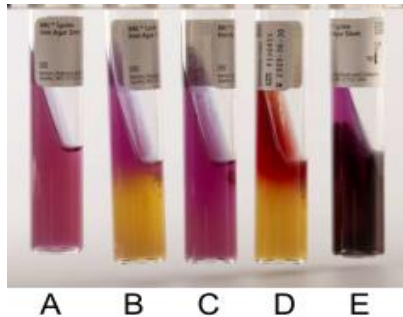
Citrobacter freundii ATCC 43864 (лизин тест негативан)

- Подлогу извадити из фрижидера и темперирати на собној температури
- Преконтролисати изглед подлоге и одбацити ако не одговара (кратка дубина, контаминација, дефекти, сува подлога)
- LIA агар убости 2 пута дубину подлоге до 3-5 mm близу дна
- Извући пикерицу из дубине и инокулисати целу косину подлоге змијоликим покретима
- Ако се користи LDC бујон улили после инокулације, густина инокулума према упутству произвођача, минерално уље на површину како би се спречила оксидација створених алкалних продуката
- Затворити епрувету лабавим металним/памучним затварачем
- Инкубирати преконоћно на 36±1 °C.
- Регистровати раст и промену боје у дубини подлоге, уколико је негативна продужити инкубацију до 40-48 часова и прочитати

Табела 1. Интеретација изгледа LIA агара

Микроорганизам	Косина	Дубина	H ₂ S	LDC тест
<i>Salmonella</i> (већина)	алкална/љубичаста	алкална/љубичаста	да	Позитиван
<i>Citrobacter</i>	алкална/љубичаста	кисела/жута	да	Негативан
<i>Proteus</i>	алкална/црвена или смеђа	кисела/жута	не	Негативан
<i>Providencia</i>	алкална/црвена	алкална/црвена	не	Негативан
<i>Escherichia</i>	алкална/љубичаста	кисела/жута	не	Негативан

	СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК 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>				
	Биохемијска идентификација <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>				
Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:	
I	10/13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_BH5a	



A: Uninoculated LIA
 B: LDC negative /lysine deaminase negative/ H₂S negative (*Citrobacter freundii*)
 C: LDC positive /lysine deaminase negative/ H₂S negative (*Salmonella* ser. Typhi)
 D: LDC negative /lysine deaminase positive/ H₂S negative (*Proteus mirabilis*)
 E: LDC positive /lysine deaminase negative/ H₂S positive (*Salmonella* ser. Newport)

Е) Тест коришћења цитрата (Simmons цитрат агар)

Simmons цитратни агар садржи цитрат као једини извор угљеника односно енергије и амонијумове соли као извор азота. Раст бактерије на подлози значи да је дошло до коришћења цитрата, метаболисањем цитрата разлажу се амонијумове соли до амонијака, ствара се алкална средина и боја индикатора бромтимол плаво се мења из зелене у „краљевско“ плаву при рН 7.6.

Са изузетком неколико врста, **цитрат је позитиван код:** *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp, *Edwardsiella* spp., *Providencia* spp. трибус *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp.,

....**цитрат је негативан код:** *Escherichia* spp. *Shigella* spp., *Morganella* spp. *Yersinia* spp.,


... **цитрат је варијабилан код:** *Proteus* spp.

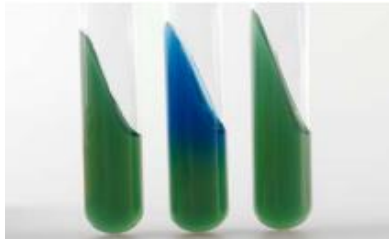
Контрола квалитета

Salmonella Enteritidis ATCC 13076 (цитрат-позитиван тест)

Escherichia coli ATCC 25922 (цитрат-негативан тест)

- Подлогу извадити из фрижидера и темперирати на собној температури
- Преконтролисати изглед подлоге и одбацити ако не одговара (кратка дубина, контаминација, дефекти, сува подлога)
- Тест увек урадити први у панелу да се не би добили лажно-позитивни резултати
- Змијоликим покретима езе инокулисати целу косину подлоге
- Затворити епрувету лабавим металним/памучним затварачем
- Инкубирати преконоћно на 36±1 °С
- Некада инкубација може да се продужи на 4 дана
- Обилан раст на косини без промене боје може значити позитиван тест; треба наставити инкубацију и уколико се ни тада не промени боја, поновити тест са мањим инокулумом!

	СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК 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>				
	Биохемијска идентификација <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>				
Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:	
I	11/13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_BH5a	

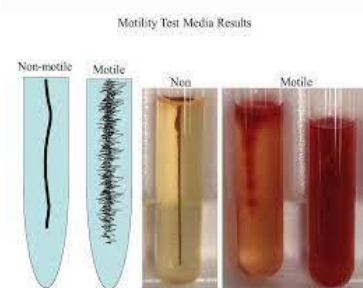


A: Uninoculated agar
 B: Citrate Positive (*Salmonella*)
 C: Citrate Negative (*E. coli*)

Ф) Тест покретљивости (опциони тест)

Покретљивост бактерија се осим микроскопски испитује тестом у епрувети. Получврста подлога, 0.5% хранљивог дубоког агара, у епрувети се засеје тестираном културом у виду линије кроз дубину подлоге. Покретне бактерије ће мигрирати ван линије засејавања и формирати »вео« или дифузно замућење подлоге а непокретне ће расти само дуж линије засејавања.

Тест се може изводити у вишеккомпонентној подлози попут получврстог SIM агара или МИО агара у којима је могуће и извођење индол теста коришћењем Ковач реагенса, детекција црног преципитата H_2S (SIM агар) или декарбоксилација орнитина (МИО агар).




Цртеж лево: непокретна бактерија
 десно: покретна бактерија

Слика лево: непокретна бактерија
 у средини: покретна бактерија
 десно: покретна бактерија

Контрола квалитета SIM агара

Salmonella Enteritidis ATCC 13076 тест позитиван (дифузан раст ван линије засејавања)
Shigella flexneri 2b ATCC 12022 тест негативан (раст на линији засејавања)

- Подлогу извадити из фрижидера и темперирати на собној температури
- Преконтролисати изглед подлоге и одбацити ако не одговара (сува, контаминација)
- Убости дубину подлоге, извући езу из дубине
- Затворити епрувету лабавим металним/памучним затварачем.
- Инкубирати преконоћно на 36 ± 1 °C
- Регистровати раст дуж линије засејавања подлоге
- Уколико је подлога мултикомпонентна МИО агар за детекцију индола и ODC поступити по упутству произвођача

	СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК				
	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>				
Биохемијска идентификација <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>					
	Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
	I	12/13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_BHSa

8. Укрштање са другим поступцима

- СОП_Бактериолошки преглед столице за *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* spp.
- СОП_Одржавање бактеријских култура за контролу квалитета

9. 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. https://antimicrobialresistance.dk/CustomerData/Files/Folders/6-pdf-protocols/62_gfn-stool-culture-nov2010.pdf

10. Додатак

Прилог 1. Упоредни биохемијски профили *Salmonella* spp.

Табела 1. Упоредни биохемијски профили *Salmonella* spp.
после инкубације 18-24 ч/36°C

Минимални панел биохемијских тестова	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (NTS* већина)	<i>Salmonella</i> Typhi	<i>Salmonella</i> Paratyphi A
TSI (косина)	алкална/црвена	алкална/црвена	алкална/црвена
TSI (дубина)	кисело/жута	кисела/жута	кисела/жута
TSI (H ₂ S)	+	брк/у трагу	нема
TSI (гас)	+	нема	+
LIA или LDC бујон	+	+	-
Urea (Christensen)	-	-	-
Citrat (Simmons)	+	-	-
ONPG	-	-	-



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

Биохемијска идентификација *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
I	13/13	01/12/2023	Наташа Галић шеф референтне лабораторије	SOP_BHSa

Прилог 2. Сlike биохемијских профила *Salmonella* spp. (NTS), *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Shigella* spp.

Salmonella spp. (NTS)



A B C D

S. Typhi



A B C D

S. Paratyphi A



A B C D

Citrobacter freundii



A B C D

Proteus mirabilis



A B C D

Shigella spp.



A B C D

Легенда

- A- TSI / Kligler агар
- B- Уреа агар
- C- LIA агар
- D- Цитрат агар