




СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК

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

Серолошка идентификација Salmonella Enteritidis и Salmonella Typhi

Издање:	Страница:	Важи од:	Ауторизација:	Ознака:
I	1//6	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> Серолошка идентификација <i>Salmonella Enteritidis</i> u <i>Salmonella Typhi</i>				
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
	I	01/12/2023	2/6	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_SE/ST

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 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 „**Серолошка идентификација *Salmonella Enteritidis* u *Salmonella Typhi***“ је предвиђена за лабораторије у секундарном и терцијарном нивоу здравствене заштите како би се у кратком временском периоду идентификовали најважнији серотипови у Србији, најчешћи *S. Enteritidis* и узрочник системске инфекције *S. Typhi*.

Према Правилнику о ценама лабораторијских здравствених услуга на примарном, секундарном и терцијарном нивоу („Сл. гласник РС“ бр. 132/21) наведена услуга је означена шифром L020347.

	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> Серолошка идентификација <i>Salmonella Enteritidis</i> и <i>Salmonella Typhi</i>				
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
I	01/12/2023	3/6	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_SE/ST	

1. Наслов

Серолошка идентификација *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhi*

2. Предмет

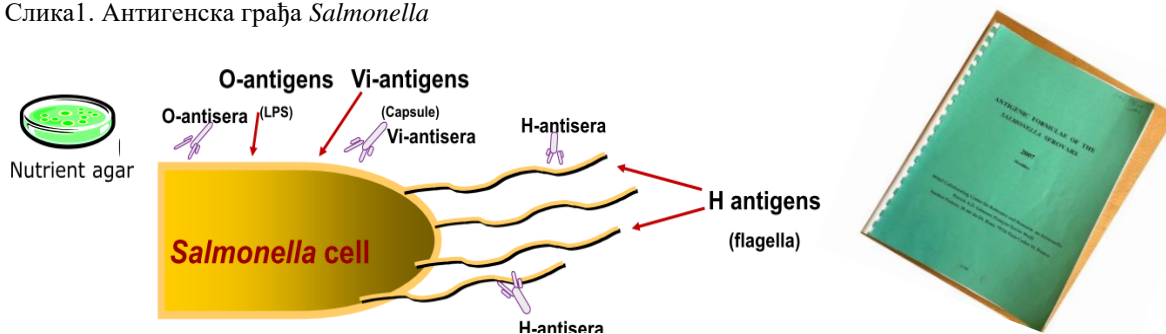
СОП описује методу имуноаглутинације на плочици у циљу идентификације најважнијих серотипова *S. Enteritidis* и *S. Typhi* одређивањем соматских „О“ и флагеларних „Н“ антигена (даље серотипизација).

Серотипизација је метод који се користи за епидемиолошку типизацију бактерија. Код *Salmonella* се заснива на идентификацији антигена, соматских липополисахаридних-О, флагеларних протеинских Н и код неких површног полисахаридног Vi антигена. Већина серотипова *Salmonella* је бифазна тј. експримира две фазе Н-антигена, али нису ретке монофазне, афазне и трифазне варијанте.

Идентификација серотипова се заснива на комбиновању откривених антигена коришћењем поли-и-моновалентних специфичних антисерума а тумачење према Kauffmann-White схеми. *S. Enteritidis* и *S. Typhi* су монофазни серотипови који припадају серогрупи О:9 (D1) (Слика 1).

Антигенска грађа *S. Enteritidis* је 1,9,12 : g,m : - , а *S. Typhi* 9,12[Vi] : d :- те за идентификацију ових серотипова треба специфичним *Salmonella* антисерумима идентификовати следеће факторе: О:9; Н:g; Н:m; Н:d; Vi. Изузеци код ових серотипова могу имати и друге придружене антигене али се идентификација ради у НРЛ

Слика1. Антигенска грађа *Salmonella*




3. Скраћенице и дефиниције

ATCC	American Type Culture Collection
IVD	<i>in vitro</i> медицинско средство
KW	Kauffmann-White схема
РГ	Ризична група микроорганизама или 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

	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> Серолошка идентификација <i>Salmonella Enteritidis</i> и <i>Salmonella Typhi</i>				
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
	I	01/12/2023	4/6	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_SE/ST

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

5. Подлоге, реагенси

- Хранљиви агар (НА) укошен или у петри шољи
 - 12-18% агара у подлози
 - рН~7.0 после стерилизације
- *Salmonella* О групни и Н фазни антисеруми
- 0.85% NaCl (FR)
- референтна култура *S. Enteritidis* ATCC 13076

6. Опрема и потрошни материјал

- Инкубатор за аеробну култивацију на 35±1 °С
- Фрижидер
- Тамна подлога
- Предметна стакла
- Стерилне езе
- Рукавице

7. Контрола квалитета

Врши се у циљу провере квалитета антисерума. Серуми се чувају у фрижидеру а пре употребе темперирају у амбијенталним условима пола часа. Квалитет је гарантован до истека рока трајања. Обзиром да су IVD медицинска средства неопходно је да се набављају са сертификатима о квалитету.

За контролу користити *S. Enteritidis* ATCC 13076 поступком идентичним наведеним у поглављу 8.

8. Процедура


*Серотипизација културе се врши са неселективне подлоге под условом да је извршена биохемијска идентификација рода *Salmonella* или врсте *Salmonella enterica*! Не препоручује се аглутинација са подлога које садрже шећере због могућности измењених реакција (слабија реактивност).*

Дан 1.

- Биохемијски идентификован изолат сублуктивисати на НА
- Инкубирати преконоћно у инкубатору за аеробну култивацију на 35±1 °С

Дан 2.

- Ставити кап FR на предметно стакло и у њој емулговати тестирану културу са НА
- Суспензија треба да је хомогено замућена без накупљених ћелија (*S* форма engl. smooth)

	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> Серолошка идентификација <i>Salmonella Enteritidis</i> и <i>Salmonella Typhi</i>				
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
I	01/12/2023	5/6	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_SE/ST	

- Ако се уоче накупине ћелија тестирана култура је у R форми (енгл. rough) па серотипизација није могућа. Изолат послати у НРЛ.
- После провере S форме, у суспензију укапати кап **поливалентног-O серума**, промешати суспензију езом или штапићем и ротирати предметно стакло напред-назад 30" изнад тамне подлоге уз упадно светло (Слика 2)
- Поли-O-антисерум садржи антитела на групне антигене најзаступљенијих серогрупа *Salmonella*. Ако се појави аглутинација значи да бактерија садржи неке од O-антигена чија се антитела налазе у поли-O серуму
- Аглутинација се уочава у облику зрнастих партикула (аглутинациона мрежа) које се прогресивно умножавају током ротације стакла (Слика 3)
- Направити на новом предметном стаклу нову кап суспензије културе и додати једну кап **моновалентног O:9 серума**, поновити поступак ротације
- Уколико се сумња на *S. Typhi* обавезно направити на новом предметном стаклу кап суспензије културе и додати једну кап **моновалентног Vi серума**, поновити поступак ротације, за доказивање Vi антигена
- Метод и процедура детекције H-антигена је идентична наведеној процедури. Уместо поли-O и моновалентних O серума користе **се поли – и – моновалентни H серуми**. Формирани H-аглутинати су ситно зрнасти
- Обавезно регистровати у табели детектоване антигене као и негативне реакције (Табела 1.)




Слика 2, лево Укапавање серума у суспензију

Слика 3, десно Реакција аглутинације одсутна (Neg)/присутна (Pos)

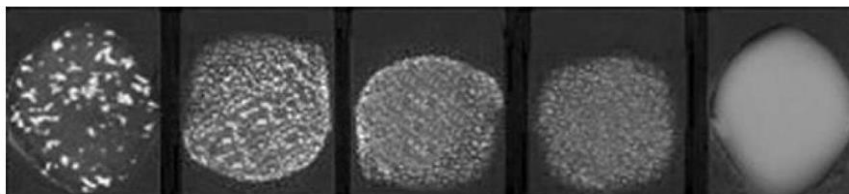
Табела 1. Регистровање и тумачење детектованих O-H-Vi-антигена

O антигени	O антисеруми						Серотип
	Поливалентан	O:9	O:46				
O:9	+	+	-				
Vi антиген	+	Vi антисерум					
		+	/				
H антигени	H антисеруми						
	H:G-m,t	H:g,m	H:m	H:p,q,u,t	H:s	H:d	
H:g,m	+	+	+	-	-	/	S. Enteritidis
H:d	-	/	-	/		+	S. Typhi
Напомена	+ присутна аглутинација; - одсутна аглутинација; / не тестирати						

	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> Серолошка идентификација <i>Salmonella Enteritidis</i> u <i>Salmonella Typhi</i>				
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
I	01/12/2023	6/6	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_SE/ST	

- Није неопходно али је корисно забележити и јачину аглутинације која се означава од 1+ до 4+ зависно од густине формиране аглутинационе мреже (Слика 4)

Слика 4. Реакција аглутинације на стаклу



4+ 3+ 2+ 1+ Negative

- 4+ све бактеријске ћелије аглутинирале, бистар серум на стаклу
- 3+ око 75% бактеријских ћелија аглутинирало
- 2+ око 50% бактеријских ћелија аглутинирало
- 1+ око 25% бактеријских ћелија аглутинирало
- Negative - млечна суспензија без аглутинације

9. Веза са документом

1. SOP_Серолошка идентификација серогрупе *Salmonella enterica*

10. Референце

1. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars 9th edition PAD Grimont. FX Weill. Institut Pasteur. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 2007. Paris https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf
2. Serotyping of *Salmonella enterica* O and H antigens. Health and Digital Executive Agency. May 2022. https://www.fwdamr-reflabcap.eu/-/media/arkiv/projekt-sites/fwdamrreflabcap/events/salmonella/serotyping-of-salmonella-enterica-o-og-h-antigen_final.pdf
3. Правилник о превентивним мерама за безбедан и здрав рад при излагању биолошким штетностима. Службани гласник РС. Бр 96/20 и 115/20.
4. 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>