




СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК

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

Серолошка идентификација серогрупе Salmonella enterica

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 серогрупе <i>Salmonella enterica</i>					
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
	I	01/12/2023	2/6	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_AgO

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, јерсениоза, 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.

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 серогрупе *Salmonella enterica*“** је предвиђена за лабораторије у секундарном и терцијарном нивоу здравствене заштите али није обавезујућа обзиром на обавезу лабораторија да шаљу изолате на коначну идентификацију / потврду у НРЛ.

Према Правилнику о ценама лабораторијских здравствених услуга на примарном, секундарном и терцијарном нивоу („Сл. гласник РС“ бр. 132/21) наведена услуга је означена шифром L020339.

	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 серогрупе <i>Salmonella enterica</i>					
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
	I	01/12/2023	3/6	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_AgO

1. Наслов

Серолошка идентификација серогрупе Salmonella enterica

2. Предмет

СОП описује методу имуноаглутинације на плочици у циљу идентификације најважнијих серогрупа *Salmonella* одређивањем соматских „О“ антигена употребом специфичних групних О-антисерума (даље серотипизација).

Важно је познавати и владати методом јер је неопходна за идентификацију најважнијих серотипова *S. Enteritidis* и *S. Typhi*. Одређивање серогрупе осталих серотипова у оквиру врсте *Salmonella enterica* је пожељно али не и неопходно у локалним и регионалним лабораторијама обзиром на обавезу јавно-здравствених и клиничких лабораторија да редовно шаљу изолате на идентификацију/потврду у НРЛ.

Одређивање серогрупе *Salmonella* се заснива на идентификовању липополисахаридних О-антигена јединствених за групу употребом поли-и-моновалентних специфичних антисерума и тумачењу према Kauffmann-White схеми. *S. enterica* је подељена у 67 серогрупа на основу соматских О-антигена од којих су за здравље људи најчешће и због тога најважније *Salmonella* из група О:4 (О:В), О:7 (О:С₁), О:8 (О:С₂-С₃), О:9 (О:Д₁).

У Републици Србији не постоји довољан избор регистрованих *Salmonella* серума. Бројне су палете поливалентних (Poly, ОМА, ОМВ, ОМД, ОМС, ОМЕ, ОМФ, ОМГ) и моновалентних серума за одређивање свих О антигенских фактора. Приликом набавке је важно направити рационалан избор и комбинацију серума како би потребе биле задовољене а цена коштања анализе била у складу са тренутним Правилником о ценама.

3. Скраћенице и дефиниције


АТСС	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 то предвиђене контејнере за стерилизацију инфективног отпада. *Salmonella* spp. припадају микроорганизама 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

	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 серогрупе <i>Salmonella enterica</i>					
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
	I	01/12/2023	4/6	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_AgO

- рН~7.0 после стерилизације
- *Salmonella* О групни антисеруми
- 0.85% NaCl (FR)
- референтне културе из АТСС или *in house* изолати са различитим О антигенима добијеним на захтев од НРЛ

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 референтне културе следећи поступак наведен у поглављу 8.

8. Процедура


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

Дан 1.

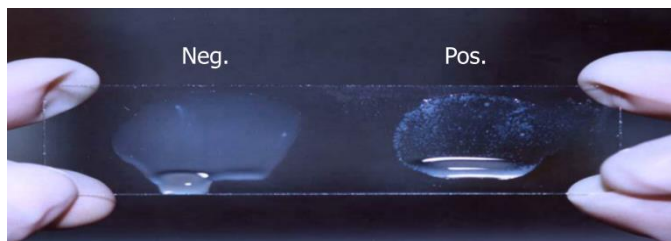
- Биохемијски идентификован изолат *Salmonella* сублуктивисати на НА
- Инкубирати преконоћно у инкубатору за аеробну култивацију на 35±1 °С

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)
- Ако се уоче накупине ћелија тестирана култура је у R форми (енгл. rough) па серотипизација није могућа. Изолат послати у НРЛ. Слелпљивање ћелија је последица измене у спољној ћелијској мембрани
- После провере S форме, у суспензију укапати кап **поливалентног-О-серума**, промешати суспензију езом или штапићем и ротирати предметно стакло напред-назад 30" изнад тамне подлоге уз упадно светло (Слика 1)

	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 серогрупе <i>Salmonella enterica</i>				
Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:	
I	01/12/2023	5/6	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_AgO	

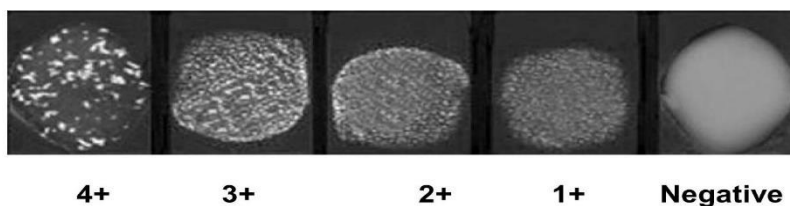
- Поли-О-антисерум садржи антитела на групне антигене најзаступљенијих серогрупа *Salmonella*, најчешће од група О:А-Е или О:А-Ф + Vi
- Ако се појави аглутинација значи да бактерија садржи неки од О-антигена чија се антитела налазе у поли-О серуму
- Аглутинација се уочава у облику зрнастих партикула (тродимензионална аглутинациона мрежа) које се прогресивно умножавају током ротације стакла (Слика 2)
- Препорука је да се прво узимају моновалентни-О-серуми за најчешће серогрупе
- На новом предметном стаклу направити нову кап суспензије културе и додати једну кап **моновалентног О:9 серума**, поновити поступак ротације
- Уколико је одсутна аглутинација поновити поступак са **О:4,5 серумом**; или О:4; уколико се јави аглутинација поновити поступак са О:5 али није неопходно
- Уколико је одсутна аглутинација у О:4 нема потребе пробати у О:5 антисеруму
- Уколико није било аглутинације претходно пробати поливалентним **О:6,7,8** и уколико се аглутинација појави употребити моновалентне серуме О:7 односно О:8, односно О:6 (ако је О:8 позитиван)
- Уколико није било аглутинације употребити поливалентан који садржи антитела за **О:1,3,10,15,19 (О:Е1-Е4)**, а уколико се аглутинација појави употребити моновалентне серуме О:10, О:15; О:19 у зависности од расположивости серума
- Обавезно регистровати у табели детектоване антигене као и негативне реакције (Табела 1.)
- Није неопходно али је корисно забележити и јачину аглутинације која се означава од 1+ до 4+ зависно од густине формиране аглутинационе мреже (Слика 3)
- Изолат послати у НРЛ на коначну идентификацију




Слика 1, лево Укапавање серума у суспензију

Слика 2, десно Реакција аглутинације одсутна/присутна

Слика 3. Реакција аглутинације на стаклу са легендом



- 4+ све бактеријске ћелије аглутинирале, бистар серум око партикула
 3+ око 75% бактеријских ћелија аглутинирало

	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 серогрупе <i>Salmonella enterica</i>					
	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:	Ознака:
	I	01/12/2023	6/6	Наташа Галић Шеф референтне лабораторије	SOP_AgO

2+ око 50% бактеријских ћелија аглутинирало

1+ око 25% бактеријских ћелија аглутинирало

Negative - млечна суспензија без аглутинације

9. Веза са документом

1. СОП_Биохемијска идентификација *Salmonella enterica*
2. СОП_Серолошка идентификација *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhi*

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. https://www.fwdamr-reflabcap.eu/-/media/arkiv/projekt-sites/fwdamrreflabcap/events/salmonella/serotyping-of-salmonella-enterica-o-og-h-antigen_final.pdf
3. Правиник 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>