

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			МИ-10-008
<i>Испитивање антигенске грађе бактерија – серотипизација Salmonella spp.</i>				
Страна 1 од 4	Издање:	Важи од:	Одобрио:	Копија број
	1	2021-04-02	др Санда Лазић руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

Назив анализе	Испитивање антигенске грађе бактерија – серотипизација
Врста узорка	Чиста бактеријска култура са крвног агара, косог агра (двоструки или троструки шећер), сумњива на салмонелу (ситан раст на косини, доња половина шећера црна од H ₂ S, косина непромијењена, шећер без мириса, има гас сем <i>S. Typhi</i>).
Узимање и транспорт узорка	Помоћу стерилне езе.
Пријем и протокол	-
Обрада узорка	Колоније сумњиве на салмонелу (ситне, глатке, сјајне, конвексне, равних рубова, прозирне, лактоза негативне, често са црном тачком на средини) се са СС подлоге пикирају стерилном, охлађеном убодном езом и засијавају на двоструки или троструки шећер, те потом инкубирају 24h у инкубатору на 37°C, а потом се приступа аглутинацији.
Подлоге и реагенси	Аглутинишући серуми: поливалентни серум (А-Е), поливалентни Н и О серуми, моновалентни Н и О серуми, физиолошки раствор, култура салмонеле. Фрижидер, инкубатор, плинса боца са пламеником, стаклене плочице (предметна стакла), комплет еза, тамна стаклена плочица.
Апарати	Фрижидер, инкубатор, плинса боца са пламеником, стаклене плочице (предметна стакла), комплет еза, тамна стаклена плочица.
Услови рада	Стандардни микроклиматски услови за рад микробиолошких лабораторија, серуми се чувају у фрижидеру на +4°C, потребно их је загријати на собној температури 20 минута прије почетка рада (аглутинације). Цијели процес рада се одвија уз присуство пламеника.
Опис анализе	Аглутинација на плочици користи се у рутинском раду као квалитативна реакција за серолошку идентификацију испитиване културе. Утврђивање антигенског састава испитиване бактерије у циљу њене серолошке идентификације, врши се помоћу антисерума са познатим аглутининима. 1. Прво се врши доказивање соматских антигена (соматски О-антигени који су обиљежени бројевима) примјеном поливалентних, затим моновалентних антисерума, 2. Затим се доказују флагеларни Н антигени обје фазе (специфична фаза 1 се означава малим словом или малим словом са нумеричким индексом и неспецифична фаза 2, која се означава бројевима или малим словом), 3. Капсуларни Vi антиген имају инкапсулиране бактерије рода <i>Salmonella</i> (<i>Salmonella Typhi</i>). Уколико долази до аглутинације Vi антисерумом, да би се доказали други антигени, суспензију загријавати 10 минута на 100°C, да се инактивира капсуларни антиген. Када се охлади, ретестира се антисерумима А-Е. Количина Vi-антигена се губи и субкултивисањем (V-W варијација). Аглутинација на плочици се изводи тако што се на један крај стаклене

Болница Бијелина	Страна 2 од 4	Издање:	Важи од:	МИ-10-008
		1	2021-04-02	

	плочице стави кап (капаљком или езом) познатог специфичног серума, а на други крај плочице кап Ф.Р., затим се стерилном охлађеном омчастом езом, све у присуству пламеника дода мало свјеже испитиване културе. Колоније сумњиве на салмонеле са двоструког или троструког шећера се користе за аглутинацију. При томе је важно да се за аглутинацију са О-серумима узима дио културе који је порастао на горњој половини косине, док за Х-аглутинацију треба узети културу са доњег дијела косине, гдје је подлога увијек влажна. Езом се узима мала количина културе и најприје се мало размути на предметном стаклу у близини капи серума, а тек затим помијеша са серумом чиме се омогућује хомогено размућивање бактеријске масе. Исто се направи и са капи Ф.Р. на другој страни плочице. Предметно стакалце се ухвати између палца и кажипрста благо ротира и реакција се читава за пар секунди најбоље наспрам тамне подлоге. Позитивна реакција је појава ситних бијелих честица аглутината у бистрој течности (у специфичном имуном серуму), а једнолико млијечно замућење је негативна реакција (у Ф.Р.). Ако се аглутинација појави и у Ф.Р. и дијагностичком серуму, микроорганизам је у Р форми, резултати нису валидни јер сви микроорганизи у Р форми аглутинирају у Ф.Р. Аглутинација се види простим оком и она је зрнаста или пахуљичаста у зависности да ли се ради са О или Х-аглутинишућим серумима. Серолошка реакција се читава након пар секунди за сваки аглутинишући серум.
Трајање анализе	Серолошка реакција се читава након пар секунди за сваки аглутинишући серум.
Издавање налаза	Након позитивне аглутинације тј. серотипизације салмонеле, ради се антибиограм, а обртно вријеме је дефинисано упутством УП-10-135: Узимање и транспорт узорка за микробиолошку дијагностику. Подразумијева се да је <i>Salmonella</i> spp. биохемијски потврђена или се биохемијска идентификација врши паралелно са антибиограмом. Начин издавања налаза је дефинисан упутством УП-10-133: Израда и дистрибуција извјештаја о резултатима испитивања у Служби за микробиологију са паразитологијом.
Тумачење резултата	Анализа антигенске грађе <i>Salmonella</i> омогућила је стварање Kauffmann-Whiteове шеме (таблице). Познавање принципа ове шеме значајно је, не само ради идентификације салмонела, већ и због правилне интерпретације резултата серолошких реакција. У К.В. шеми салмонеле су сврстане у групе на основу својих О-антигена карактеристичних за групу (нпр. фактор 2 је карактеристичан за групу А, фактор 4 за групу Б, фактор 9 за групу Д). Познато је око 70 О фактора и те су групе означене великим словима латинице од А-З, а следеће бројем њиховог детерминишућег О-антигена. У оквиру група налазе се серотипови, који су одређени на основу својих Н-антигена, фазе 1 и фазе 2. Поједини серотипови једне или различитих група могу да имају истовјетни Н-антиген једне фазе, али се разликују по Н-антигену друге фазе; зато је при антигеној анализи, у циљу идентификације серотипова, неопходно одредити Х-антигене обје фазе. У рутинској дијагностичкој се обично одређује групна припадност (нпр. <i>Salmonella</i> spp. серогрупе Д). Извјештај референте лабораторије садржи компетан антигени профил, дакле издаје се као серотипови нпр. <i>Salmonella</i> Enteritidis = 1, 9, 12:gm. Код човјека (98% хуманих изолата) се најчешће налазе серотипови из

Болница Бијељина	Страна 3 од 4	Издање:	Важи од:	МИ-10-008
		1	2021-04-02	

првих пет О група (А-Е) које припадају субгенусу I Kauffmann и сваки серотип има своје име. У табели 1. је приказана K.W. шема (антигенска структура) неких најчешћих серотипова Salmonella.

На основу различитих комбинација О-антигена и Х-антигена, до данас је препознато преко 3600 серотипова Salmonella. У пракси се не користе званични називи за врсте и подврсте, него се имена серотипова користе као имена врста.

Обзиром да је Salmonella Enteritidis на нашим просторима најчешћи узročник инфекција изазваних салмонелама, битно ја да у лабораторији увијек постоје антисеруми за доказивање свих антигена за ову врсту (О:1, 9,12 ; Н :g,m).

Изолати суспектни на један од следећа три серотипа: Salmonella typhi, Salmonella paratyphi, Salmonella choleraesuis, због клиничког и епидемиолошког значаја, морају бити биохемијски идентификовани и серолошки потврђени.

Табела 1.

група	серотип	О-антиген	Н-антиген	
			фаза 1	фаза 2
A	S. paratyphi A	1, (2), 12	a	-
B	S. paratyphi B	1,4,(5), 12	b	1, 2
	S. typhimurium	1,4,(5), 12	i	1, 2
	S. wien	1, 4, 12, 27	b	1, w
	S. derby	1,4,(5), 12	f, g	-
	S. agona	1, 4, 12	f, g, s	-
C ₁	S. paratyphi C	6, 7, (Vi)	c	1, 5
	S. virchow	6, 7	r	1, 2
	S. infantis	6, 7	r	1, 5
C ₂	S. newport	6, 8	e, h	1, 2
	S. blockley	6, 8	k	1, 5
	S. hadar	6, 8	z, 10	e, n, x
D	S. typhi	9, 12, (Vi)	d	-
	S. enteritidis	1, 9, 12	g, m	-
E ₁	S. anatum	3, 10	e, h	1, 6
E ₂	S. newington	3, 15	e, h	1, 6
E ₄	S. senftenberg	1, 3, 19	g, (s), t	-

Биосигурносне
мјере рада

Уобичајене мјере биосигурносне заштите за микробиолошке лабораторије (рукавице, маске, заштитна одјећа, наочале, дезинфекциона средства).

Деконтаминација

Дезинфекција, аутоклавирање, централно одлагање инф.отпада.

Литература

Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology, Koneman E.W., Philadelphia 1997.

Basic laboratory procedures in clinical bacteriology, World Health organization, Geneva, 1991.

Практикум из микробиологије и имунологије, В. Арсић...[ет. ал], Савремена администрација, Београд, 2000.

Општа и специјална бактериологија, О. Бергер-Јекић ...[ет. ал], Савремена

Болница Бијељина	Страна 4 од 4	Издање:	Важи од:	МИ-10-008
		1	2021-04-02	

	администрација, Београд, 2005. Микробиолошки лабораторијски приручник, Бранислава Коцић, Медицинска књига, Београд, 1993. Медицинска микробиологија, Џавец, Мелник, Аделберг, Савремена администрација, БГ, 1998. Лабораторијска дијагностика у клиничкој бактериологији, др Љ. Мугоша и сар., Министарство здравља Црне Горе, 2012.
Скраћенице	СС (Salmonella – Shigella agar), Ф.Р. (физиолошки раствор), К.W.-Kauffman-White шема.
Љекар	Др Санда Лазић

