

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων,
Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας,
Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Σαλμονελλών

ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΗΣ EN ISO 6579

Αθανάσιος Κατσίμπρας

2013



ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΗΣ EN ISO 6579

- Μικροβιολογία τροφίμων και ζωοτροφών – Οριζόντια μέθοδος για την
- ανίχνευση, καταμέτρηση και οροτυποποίηση της *Salmonella* spp.
- **Part 1:** Οριζόντια μέθοδος για την ανίχνευση της *Salmonella* spp.
- **Part 2:** Καταμέτρηση *Salmonella* spp με την μέθοδο μικρογραφίας πολλαπλών σωλήνων ή μέθοδος mini – MPN
- **Part 3:** Οδηγίες για την οροτυποποίηση της *Salmonella* spp.

Part 1: Οριζόντια μέθοδος για την ανίχνευση της *Salmonella* spp.

1. Σκοπός

Σκοπός της μεθόδου είναι η ανίχνευση της *Salmonella* spp.

Σε δείγματα που αφορούν :

- A. - προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και για την διατροφή των ζώων
 - περιβαλλοντικά δείγματα από τις περιοχές παραγωγής ή επεξεργασίας τροφίμων

- B. - περιβαλλοντικά δείγματα από τα στάδια της πρωτογενούς παραγωγής, όπως περιττώματα ζώων , σκόνη κ.λ.π.

Σημαντικές τροποποιήσεις στην EN ISO 6579 part 1 Ανίχνευση I

1. Ενσωμάτωση της ISO 6785 (γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα)
2. Δείγματα από το στάδιο της πρωτογενούς παραγωγής
3. Περιγραφή ανίχνευσης *S. Typhi* and *S. Paratyphi* στο Annex D : με την χρήση Selenite Cystine broth (SC) σαν εμπλουτιστικό μέσο
4. Εμπλουτιστικά μέσα :
 - πρώτο εμπλουτιστικό μέσο : επιλογή RVS ή MSRV
 - δεύτερο εμπλουτιστικό μέσο : MKTTn
 - δείγματα από το στάδιο της πρωτογενούς παραγωγής : μόνο σε MSRV
5. ο χρόνος επώασης των εμπλουτιστικών μέσων διατηρείται στις 24h, εκτός από τα δείγματα από το στάδιο της πρωτογενούς παραγωγής σε MSRV (48h εάν είναι αναγκαίο)
6. ενδείκνυται η αποθήκευση των προεμπλουτιστικών και εμπλουτιστικών καλλιεργειών στους 5 C μέχρι 72 h

Σημαντικές τροποποιήσεις στην EN ISO 6579 part1 Ανίχνευση

II

7. το XLD παραμένει το κύριο μέσο απομόνωσης
8. το στάδιο στα εκλεκτικά μέσα γίνεται λιγότερο εντεταλμένο (σωστή παρατήρηση των τυπικών ή ύποπτων αποικιών)
9. επιλογή του σωστού δεύτερου εκλεκτικού μέσου, μελέτη πίνακα Annex E
10. ταυτοποίηση μιας μόνο ύποπτης αποικίας (αντί μιας από κάθε μέσο). Εάν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό, ελέγχονται 4 επιπλέον ύποπτες αποικίες από διαφορετικά μέσα
11. επιτρέπεται παράλληλα με τα βιοχημικά να γίνεται έλεγχος καθαρότητας
12. μπορεί να γίνει επιλογή του μη εκλεκτικού μέσου (NA, TSA)

Σημαντικές τροποποιήσεις στην EN ISO 6579 part1 Ανίχνευση III

- 13.** 2 δοκιμές ταυτοποίησης γίνονται προαιρετικά β -galactosidase (ONPG) και η αντίδραση παραγωγής ινδόλης
- 14.** η δοκιμή Voges-Proskauer (VP) έχει διαγραφεί
- 15.** λεπτομέρειες για την οροτυποποίηση περιγράφονται στο part 3 της ISO 6579
- 16.** περιγράφονται οι δοκιμές απόδοσης των υποστρωμάτων Annex B
- 17.** δεδομένα επικύρωσης της χρήσης του MSRV στα τρόφιμα υπάρχουν στο Annex C

Σημαντικές τροποποιήσεις στην EN ISO 6579 part1 Ανίχνευση IV

ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (POOLING OF SAMPLES)

2 τρόποι ομαδοποίησης

- **ξηρά ομαδοποίηση** : ομαδοποίηση των υπομονάδων δείγματος
- **υγρά ομαδοποίηση** : ομαδοποίηση της προεμπλουτιστικής καλλιέργειας

2. Διαδικασία

A Προεμπλουτισμός σε μη εκλεκτικά υγρά υποστρώματα
Ενοφθαλμισμός του δείγματος σε BPW (αραίωση 1/10) και επώαση στους 37 C για 18 2h .

ΑΛΛΑΓΕΣ

1. ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

2 τρόποι ομαδοποίησης

A. Dry pooling: ξηρά

Ομαδοποίηση δειγμάτων π.χ.10 υπομονάδες δείγματος 10X25 γρ = 250 γρ και προσθέτουμε 2,250 λίτρα BPW

B. Wet pooling: υγρά

ατομικές υπομονάδες δείγματος προεμπλουτιστικές καλλιέργειες και ομαδοποίηση σε ένα εμπλουτιστικό δείγμα, π.χ.10 υπομονάδες δείγματος τότε προσθέτουμε

- 0,1 ml από κάθε επωασμένο προεμπλουτιστικό σε 100 ml RVS broth(10X0,1 ml)
- 1 ml από κάθε επωασμένο προεμπλουτιστικό σε 100 ml MKTTn broth(10X1 ml)

2. Αποθήκευση του επωασμένου προεμπλουτιστικού στους 5 C μέχρι 72 h.

B Εμπλουτισμός σε RVS broth, ημίρευστο άγαρ MSR/V και MKTTn broth

Ποσότητα ενοφθαλμίσματος : 0,1 ml σε 10 ml RVS broth και
plate MSR/V (1-3 σταγόνες ,ΑΛΛΑΓΗ)
1 ml σε 10 ml MKTTn broth

Θερμοκρασία επώασης : 41,5 C για RVS broth και MSR/V
37 C για MKTTn broth

Χρόνος επώασης : 24 3 h για RVS broth MSR/V και MKTTn broth

Τα MSR/V δεν τα απορρίπτουμε, εάν είναι αρνητικά (δεν υπάρχει ζώνη θολερότητας) στις 24 ώρες τα ξαναεπωάζουμε για 24 3 h, όσον αφορά τα δείγματα από το στάδιο της πρωτογενούς παραγωγής .

ΑΛΛΑΓΕΣ

1. Ενοφθαλμισμός

A. δείγματα τροφίμων και ζωοτροφών, περιβαλλοντικά δείγματα από τις περιοχές παραγωγής ή επεξεργασίας τροφίμων σε RVS broth ή plate MSR/V και MKTTn broth

B. περιβαλλοντικά δείγματα από το στάδιο της πρωτογενούς παραγωγής, όπως περιπτώματα ζώων , σκόνη σε plate MSR/V

2. Αποθήκευση των εμπλουτιστικών μέσων στους 5 C μέχρι 72 h.

Γ Σπορά σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα

Ενοφθαλμισμός απαραίτητα σε XLD agar και σε ένα δεύτερο θρεπτικό μέσο της επιλογής του Εργαστηρίου με διαφορετικά χαρακτηριστικά από το XLD agar .

A. δείγματα τροφίμων και ζωοτροφών, περιβαλλοντικά δείγματα από τις περιοχές παραγωγής ή επεξεργασίας τροφίμων

Ενοφθαλμισμός με κρίκο 10 μl από RVS & MKTTn σε XLD & 2ο μέσο

Ενοφθαλμισμός με κρίκο 1 μl από MSRv (όριο ζώνης θολερότητας) σε XLD & 2ο μέσο

B. περιβαλλοντικά δείγματα από το στάδιο της πρωτογενούς παραγωγής, όπως περιπτώματα ζώων , σκόνη.

Ενοφθαλμισμός με κρίκο 1 μl από MSRv (όριο ζώνης θολερότητας) σε XLD & 2ο μέσο

Επώαση των μέσων στους 37 C για 24-3 h .

ΑΛΛΑΓΕΣ : Επιλογή στο 2ο θρεπτικό , πίνακας Annex E

Δ Ταυτοποίηση

Επιλογή αποικιών για ταυτοποίηση

Σημειώνουμε τις τυπικές ή ύποπτες αποικίες (μέχρι 5 αποικίες από διαφορετικά μέσα)

Για την επιβεβαίωση, λαμβάνεται τουλάχιστον μία αποικία που θεωρείται πως είναι τυπική ή ύποπτη.

Εφόσον υπάρχουν αποικίες (καθαρή καλλιέργεια) διαθέσιμες στο εκλεκτικό μέσο γίνεται **απευθείας βιοχημική ταυτοποίηση** των υπόπτων αποικιών. Παράλληλα με τις βιοχημικές δοκιμές ενοφθαλμίζεται και μη εκλεκτικό μέσο, όπως ΝΑ, για ορολογικές δοκιμές και έλεγχο καθαρότητας.

Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία πετρί επωάζονται στους 37 C για 24h 3h

ΑΛΛΑΓΕΣ : Επιλογή 5 αποικιών από διαφορετικά μέσα, απευθείας βιοχημική ταυτοποίηση με παράλληλο έλεγχο καθαρότητας της αποικίας, επιλογή του μη εκλεκτικού μέσου

η επιλογή αποικιών απαιτεί εμπειρία

1 Βιοχημική ταυτοποίηση (3 δοκιμές)

TSI agar

Ενοφθαλμίζεται η κεκλιμένη επιφάνεια του TSI και στη συνέχεια βυθίζεται η ακίδα στον πυθμένα του υποστρώματος . Ακολουθεί επώαση σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 C για 24 3h.

Οι τυπικές καλλιέργειες Σαλμονέλλας παρουσιάζουν αλκαλική (κόκκινη) κεκλιμένη επιφάνεια με σχηματισμό αερίου και όξινο (κίτρινο) πυθμένα, με σχηματισμό H₂S (μαύρος χρωματισμός, στο 90% των περιπτώσεων .

Όταν απομονώνεται λακτόζη-θετική Σαλμονέλλα, η κεκλιμένη επιφάνεια του TSI agar είναι κίτρινη. Συνεπώς η προκαταρκτική ταυτοποίηση καλλιέργειας Σαλμονέλλας δεν πρέπει να βασίζεται μόνο στα αποτελέσματα από το TSI agar

Urea agar

Ενοφθαλμίζεται η κεκλιμένη επιφάνεια του άγαρ. Επωάζεται το υπόστρωμα στους 37 C για 24 3h και εξετάζεται κατά διαστήματα. Εάν η αντίδραση είναι θετική, η διάσπαση της ουρίας απελευθερώνει αμμωνία, η οποία αλλάζει το χρώμα του phenol red σε ροζ και στη συνέχεια σε σκούρο κερασί. Η αντίδραση είναι συνήθως ορατή μετά από 2-4 ώρες επώασης.

Οι τυπικές καλλιέργειες Σαλμονέλλας δεν υδρολύουν την ουρία, έτσι το χρώμα της ουρίας παραμένει χωρίς αλλαγή

L-Lysine decarboxylation medium

Γίνεται ο ενοφθαλμισμός ακριβώς κάτω από την επιφάνεια του υγρού υποστρώματος.

Επωάζεται το υπόστρωμα στους 37 C για 24 3h.

Η θολερότητα και ο μωβ χρωματισμός μετά από επώαση υποδεικνύει θετική αντίδραση.

Κίτρινος χρωματισμός υποδεικνύει αρνητική αντίδραση.

Οι τυπικές καλλιέργειες Σαλμονέλλας δίνουν θετική αντίδραση (Πίνακας 1)

Σε περιπτώσεις που υπάρχουν αμφιβολίες κατά την ταυτοποίηση μπορούμε επιπλέον να χρησιμοποιήσουμε το τεστ της ανίχνευσης της **β-galactosidase (ONPG)** και την αντίδραση παραγωγής **ινδόλης**

TSI		
Πυθμένας	Κίτρινο	Γλυκόζη θετικό (100%)
	Μαύρο	Σχηματισμός H ₂ S (91.6%)
	Φυσαλίδες ή χαραγές	Σχηματισμός αερίου από γλυκόζη (91,9%)
Κεκλιμένη επιφάνεια	Κόκκινο ή αμετάβλητο	Λακτόζη και/ή σουκρόζη αρνητικό (99,2%και 99,5%)
Urea agar		
	Κίτρινο, χωρίς αλλαγή χρώματος του υποστρώματος	αρνητικό (100%)
LDC		
	θολερότητα και μωβ χρωματισμός	θετικό (94,6%)

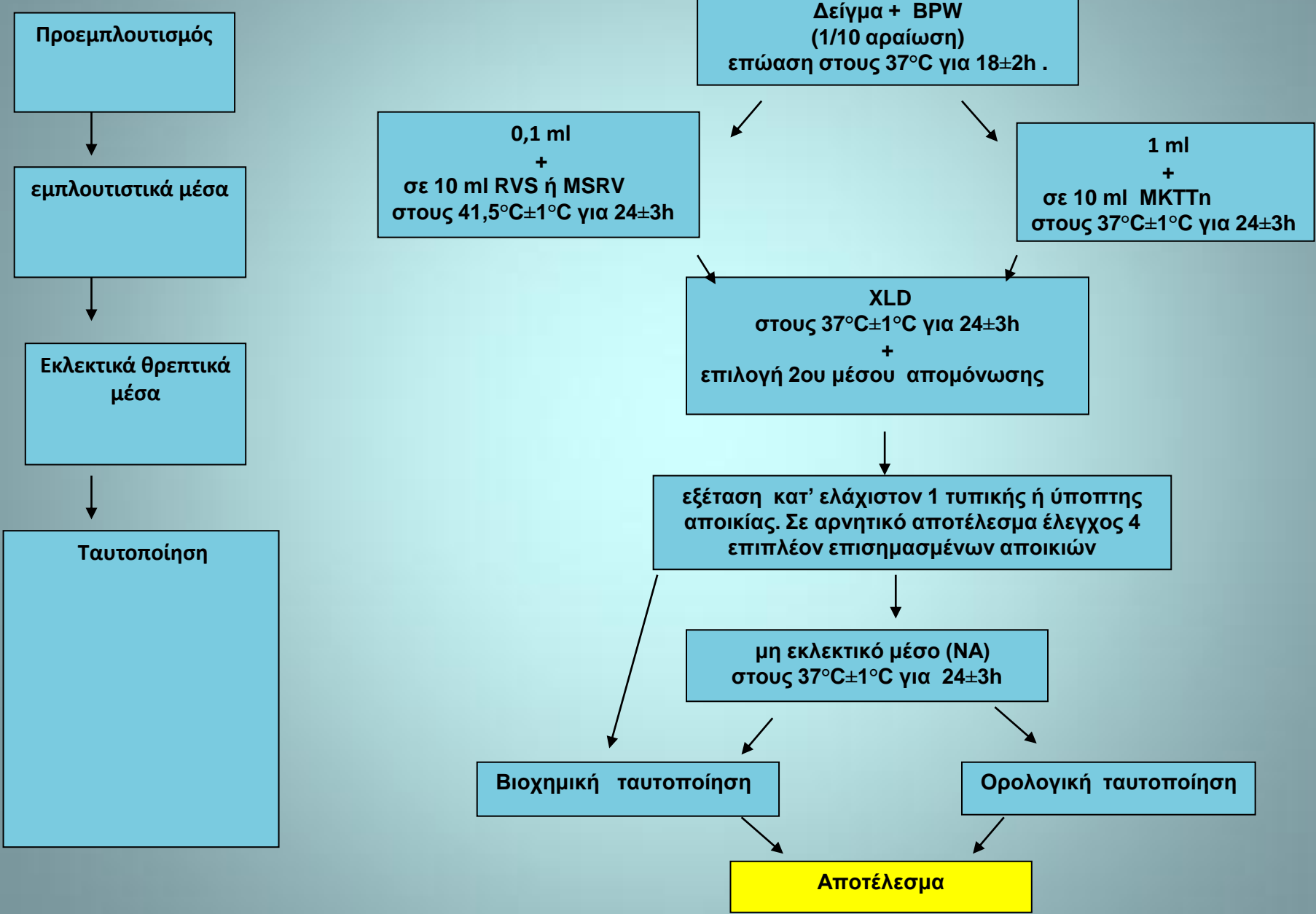
2 Ορολογική ταυτοποίηση και ορότυπος

Τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών μας δείχνουν ότι ένα απομονωθέν στέλεχος ανήκει στο γένος *Salmonella*. Η οροτυποποίηση θεωρείται απαραίτητη επίσης για την ολοκλήρωση της ταυτοποίησης στελέχους *Salmonella*.

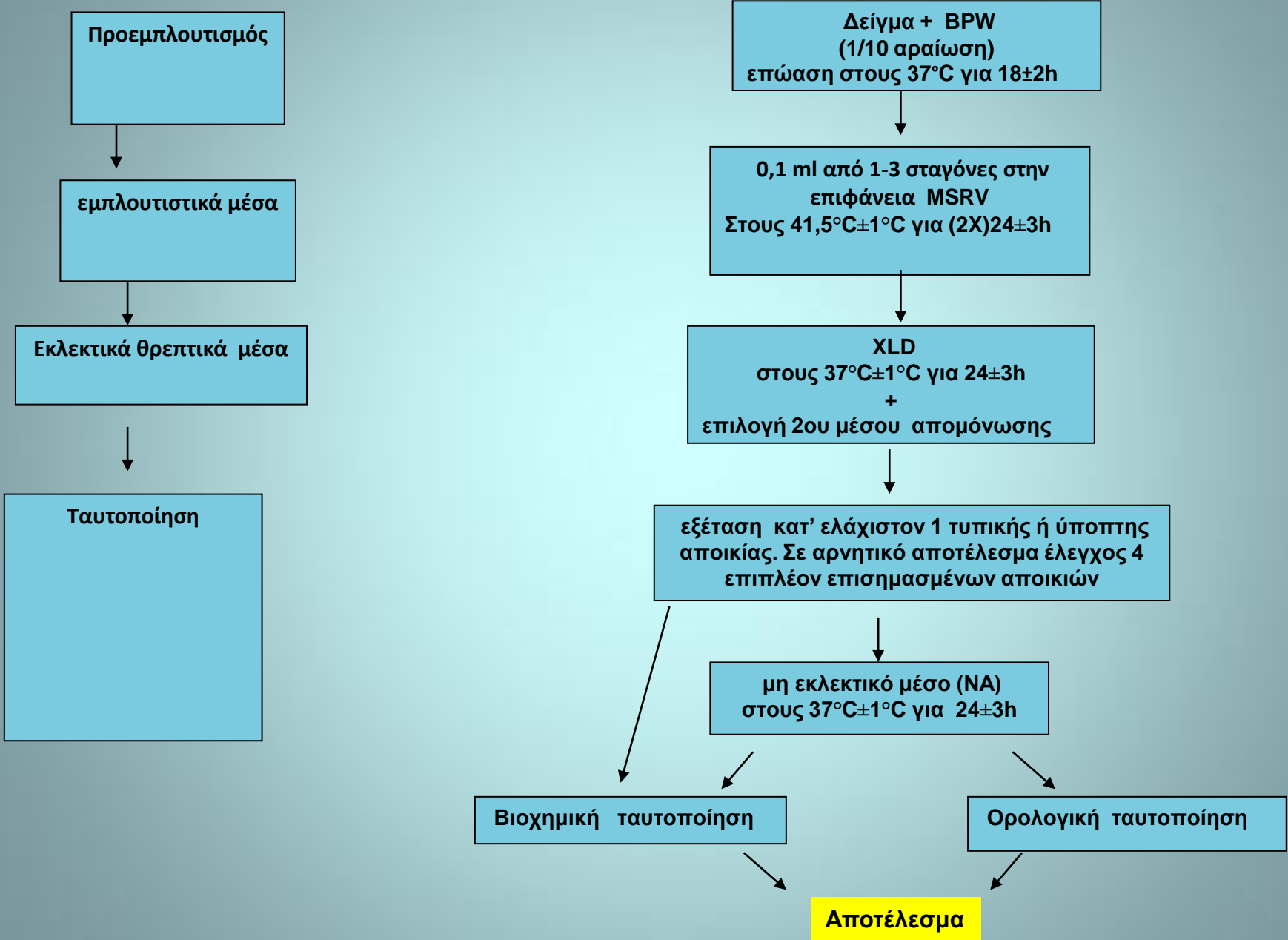
Έλεγχος για την παρουσία των αντιγόνων *Salmonella* O, Vi & H με τους κατάλληλους πολυδύναμους αντιορούς με τη μέθοδο συγκόλλησης.

Η ορολογική ταυτοποίηση δίνει επιπλέον πληροφορίες για την ομάδα που ανήκει το στέλεχος που απομονώθηκε. Καθώς επίσης με περαιτέρω ορολογική διερεύνηση γνωρίζουμε τον ορότυπο του στελέχους.

A1. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ *Salmonella* ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



A2. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ *Salmonella*
ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΠΕΡΙΤΤΩΜΑΤΑ, ΣΚΟΝΗ κ.λ.π.



Annex D

Ανίχνευση *Salmonella enterica* subspecies *enterica* Typhi and Paratyphi

1 Σκοπός

Όλοι οι ορότυποι *Salmonella* δεν ανιχνεύονται με την παραπάνω μέθοδο της ISO που περιγράψαμε.

Αυτό το παράρτημα της ISO δίνει επιπρόσθετες πληροφορίες και βήματα που πρέπει να λάβουμε υπόψιν για την ανίχνευση *Salmonella enterica* subspecies *enterica* Typhi and Paratyphi.

Σημείωση: Τα γένη του ορότυπου Gallinarum (βιότυποι Gallinarum και Pullorum) δεν είναι σημαντικά για την Δημόσια Υγεία κι έτσι δεν περιλαμβάνονται σ' αυτή την ISO. Selenite Cystine medium (SC) μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με RVS και MKTTn , όπως περιγράφεται σ' αυτό το παράρτημα.

Διαδικασία

A. Προεμπλουτισμός σε μη εκλεκτικά υγρά υποστρώματα

Ενοφθαλμισμός του δείγματος σε BPW (1/10 αραίωση) και επώαση στους 37 C για 18 2h .

B. Εμπλουτισμός

Selenite Cystine broth (SC) μπορεί να ενοφθαλμισθεί μαζί με RVS και MKTTn από την επωασμένη καλλιέργεια προεμπλουτισμού

(SC) : 1 ml καλλιέργειας προεμπλουτισμού σε 10 ml SC και επώαση στους 37 C για 24 3 h και 48 3 h.

Γ. Σπορά σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και Ταυτοποίηση

Ενοφθαλμισμός με κρίκο 10 μl από SC σε XLD και BS (Bismuth Sulfite agar) και επώαση στους 37 C για 24 3h (μετά από επώαση του SC για 24 3h και επώαση επιπλέον για 24 3 h

BS : μετά από επώαση 24 3h οι τυπικές αποικίες *Salmonella* φαίνονται μαύρες, γκρίζες ή καφετιές με ή χωρίς μεταλλικό χρώμα.

XLD : μετά από επώαση 24 3h οι τυπικές αποικίες *Salmonella* φαίνονται με μαύρο κέντρο και μια ζώνη κοκκινωπού χρώματος οφειλόμενη στην αλλαγή του χρώματος του δείκτη του μέσου.

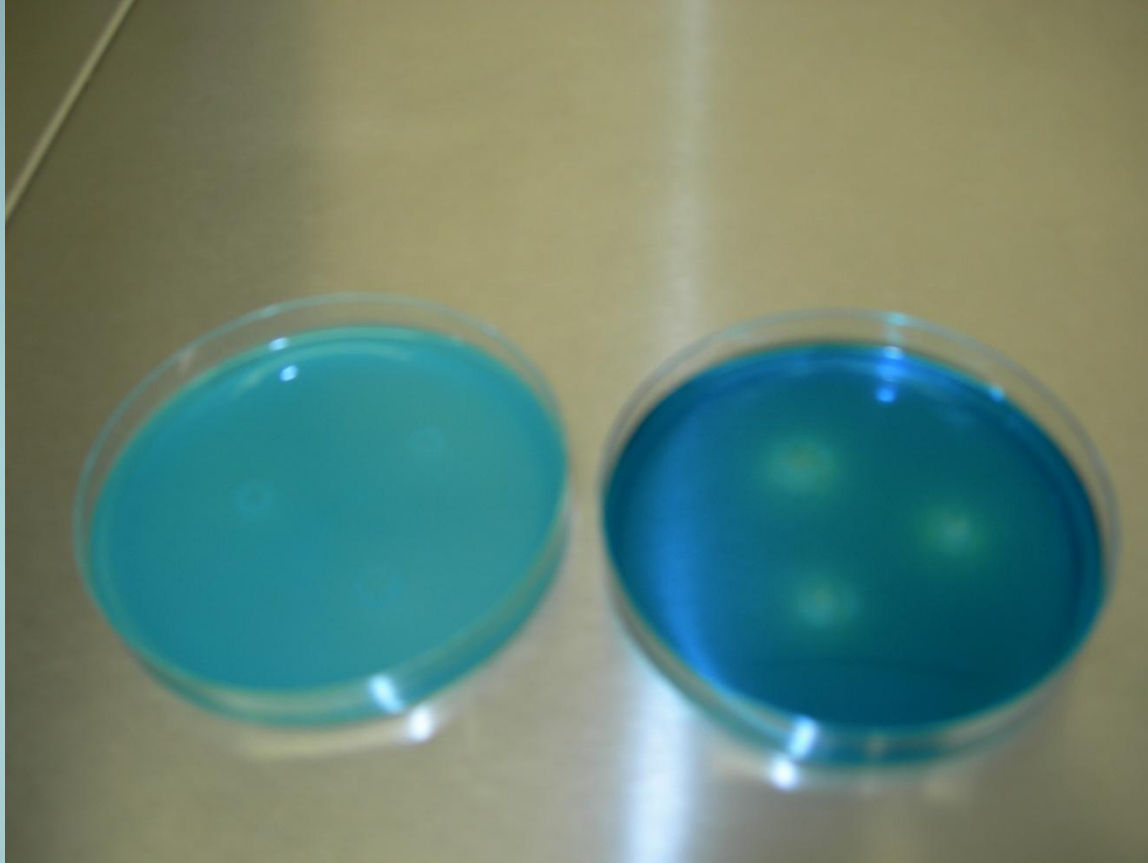
Σημειώνουμε μέχρι 5 αποικίες (τυπικές) και μη και προχωράμε σε βιοχημική και ορολογική ταυτοποίηση.



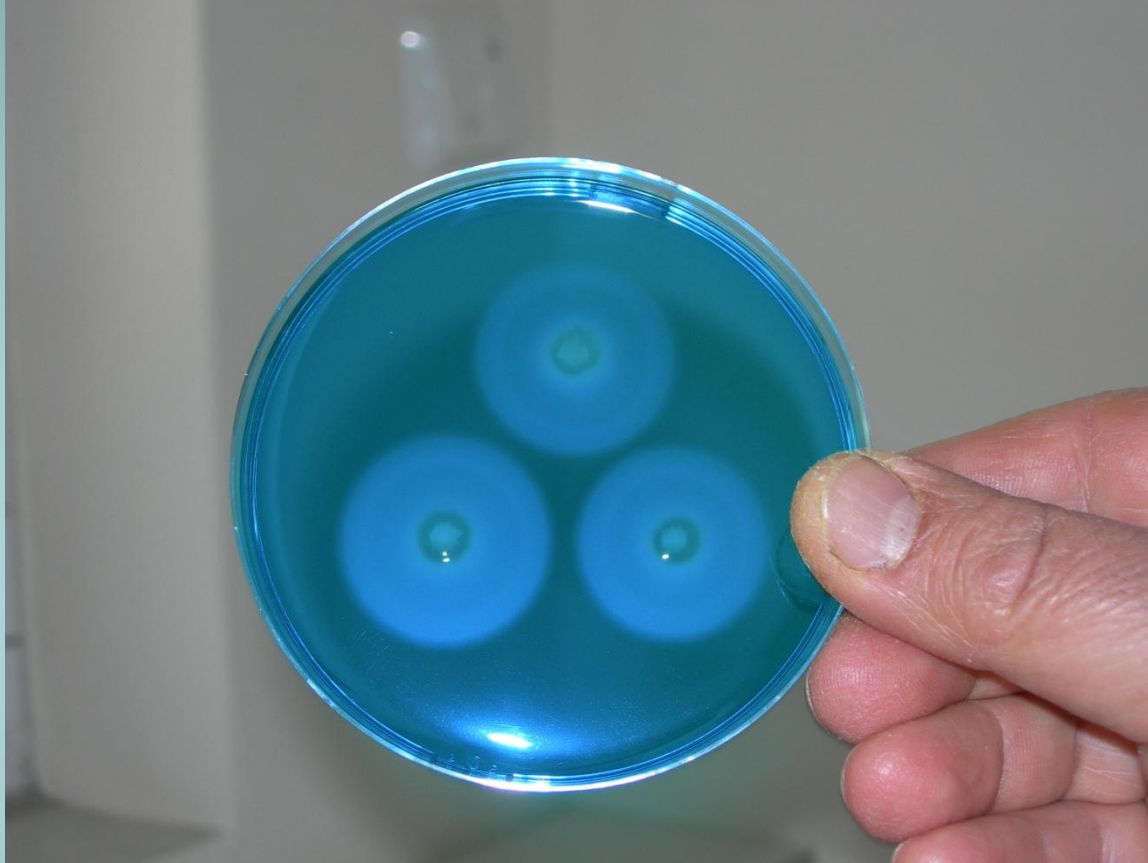
ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΕΝΟ & ΕΠΩΑΣΜΕΝΟ BRw



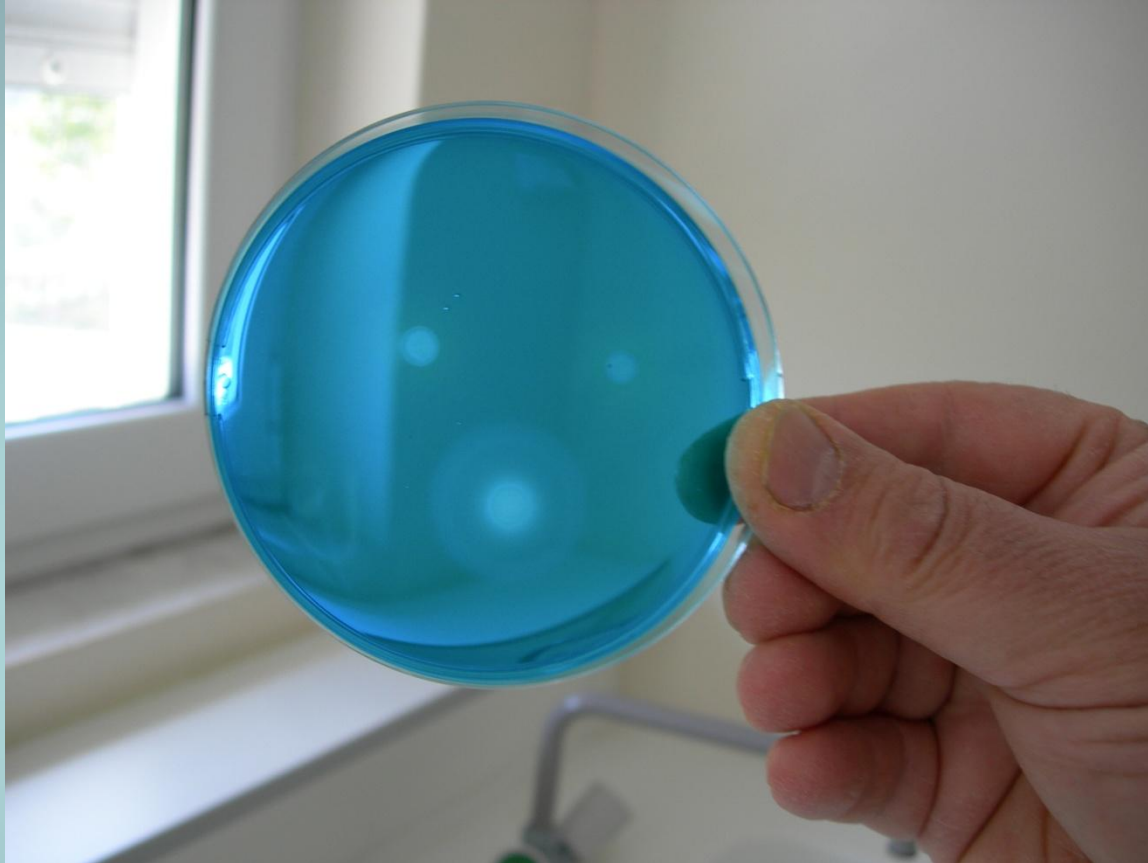
ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΕΝΑ & ΕΠΩΑΣΜΕΝΑ RVS & ΜΚΤΤ_n



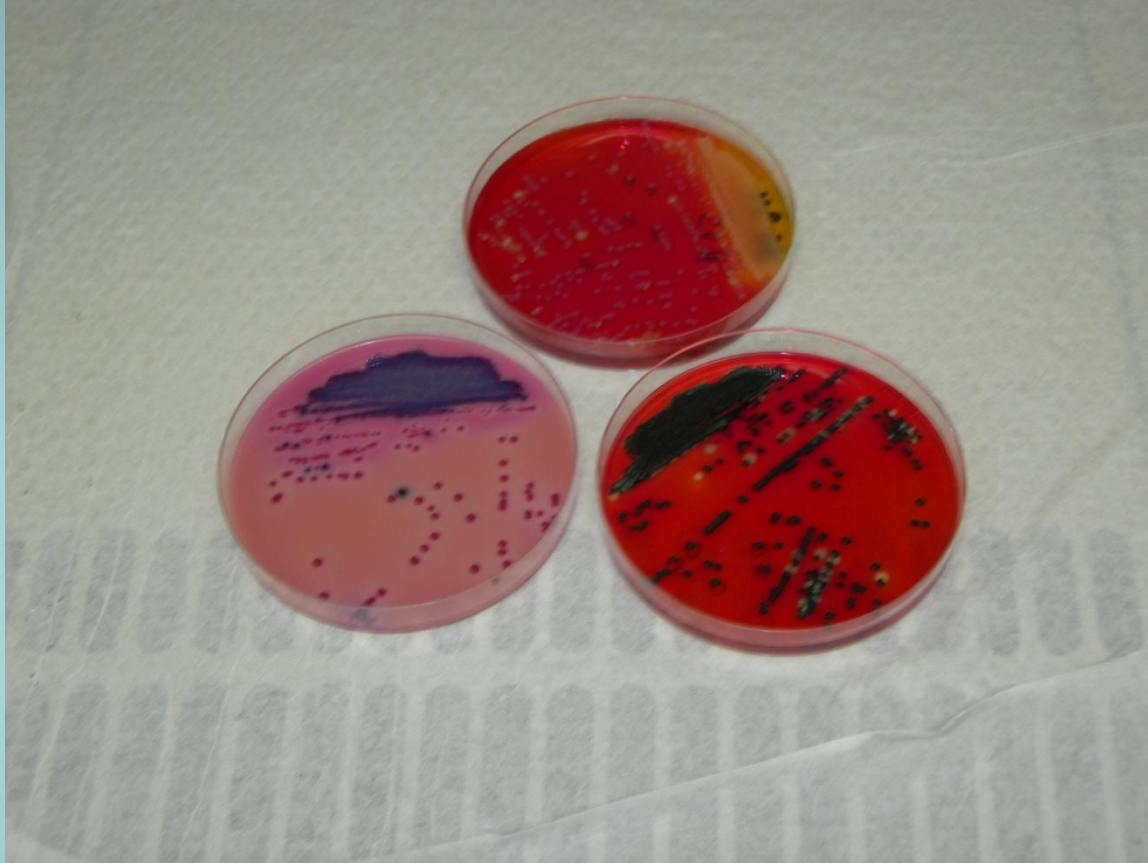
ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΕΝΑ & ΕΠΩΑΣΜΕΝΑ MSRV



ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΕΝΟ & ΕΠΩΑΣΜΕΝΟ MSRV



ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΕΝΟ & ΕΠΩΑΣΜΕΝΟ MSRV



SALMONELLA RA , BG & XLD



TSI



UREA



LYSINE DECARBOXYLASE