



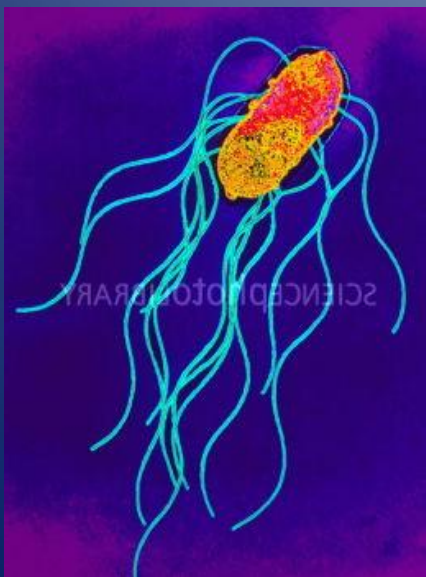
Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων,
Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας,
Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Σαλμονελλών

ISO/TS 6579-2:2012

Καταμέτρηση *Salmonella* spp
μέθοδος mini – MPN

Αθανάσιος Κατσίμπρας

2013



ISO/TS 6579-2:2012 Καταμέτρηση *Salmonella* spp με την μέθοδο μικρογραφίας πολλαπλών σωλήνων μέθοδος mini – MPN

• Σκοπός

Σκοπός της μεθόδου είναι η καταμέτρηση *Salmonella* spp. που βρίσκεται σε :

- προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και για την διατροφή των ζώων
- περιβαλλοντικά δείγματα από τις περιοχές παραγωγής ή επεξεργασίας τροφίμων
- περιβαλλοντικά δείγματα από το στάδιο της πρωτογενούς παραγωγής

Υπολογισμός με την μέθοδο πολλαπλών σωλήνων (MPN).

Η μέθοδος βασίζεται στα βήματα:

- μικρογραφία αραιώσεων,
- προεμπλουτισμός
- εκλεκτικός εμπλουτισμός

Το εκλεκτικό εμπλουτιστικό μέσο Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis-MSRV, ενδείκνυται για την ανίχνευση των **κινητών** σαλμονελλών και δεν είναι κατάλληλο για τις ακίνητες σαλμονέλλες.

- Η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για δείγματα που είναι επιμολυσμένα με πολύ μικρό αριθμό *Salmonella* spp. (<1 cfu / gr).

Νομοθετικό πλαίσιο δεν υπάρχει. Πολύ πιθανόν στο προσεχές μέλλον να τροποποιηθεί ο κανονισμός 2073/2005 ή 1441/2007.

Σημείωση :

Οι **μη κινητές Σαλμονέλλες** , *Salmonella Gallinarum* βιότυπος *Gallinarum* και *Salmonella Gallinarum* βιότυπος *Pullorum*) δεν φαίνεται να επιζούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στα περιβαλλοντικά δείγματα και για αυτό το λόγο **σπάνια** απομονώνονται από περιττώματα και περιβαλλοντικά δείγματα (όπως η σκόνη), ανεξάρτητα από τη μέθοδο. Οι αριθμοί άλλων μη κινητών ορότυπων Σαλμονελλών σε δείγματα περιττωμάτων φαίνεται να είναι γενικά **χαμηλοί**.

Για παράδειγμα, σε βιβλ. αναφορά, στην οποία 1000 περιττωματικά δείγματα ορνίθων ωοπαραγωγικής κατεύθυνσης και 900 περιττωματικά δείγματα ορνιθίων κρεατοπαραγωγικής κατεύθυνσης αναλύθηκαν, λιγότερο από το 1% του ολικού αριθμού των δειγμάτων βρέθηκαν **θετικά σε εκλεκτικό ζυμό** συγχρόνως με **αρνητικό MSR/V** (πιθανότητα για ακίνητη σαλμονέλλα).

Παρόμοιο αποτέλεσμα βρέθηκε σε Ολλανδική μελέτη με 3200 περιττωματικά δείγματα χοίρων (ανεπίσημα δεδομένα).

Από την άλλη μεριά, στην περίπτωση της παραπάνω μελέτης πάνω από το 40% των θετικών δειγμάτων **δεν θα είχαν ανιχνευθεί** (ψευδώς αρνητικά) εάν είχε χρησιμοποιηθεί μόνο ο εκλεκτικός ζυμός (Rappaport - Vassiliadis) αντί της χρήσης MSR/V.

Διαδικασία μεθόδου mini – MPN

1. Αρχική αραίωση

Προετοιμασία αρχικής δεκαδικής αραίωσης του δείγματος σε BPW



Προσθέτουμε 25 gr δείγματος σε 225 ml BPW.

2. Προεμπλουτισμός και αραιώσεις σε μη εκλεκτικά υγρά υποστρώματα

Σε μια μικροπλάκα 12-βοθρίων με άδεια τα 3 βοθρία της πρώτης σειράς, βάζουμε 2 ml **BPW** στα υπόλοιπα βοθρία (δεύτερη, τρίτη και τέταρτη σειρά των 3 βοθρίων).

Αποστειρωμένες μικροπλάκες 12 βοθρίων με βοθρία μεγέθους διαμέτρου 25mm και βάθους 20 mm (5 ml) με επίπεδο πυθμένα και σκέπασμα (tissue culture testplates).

Tissue Culture Testplates

Σημείωση 1:

Σε γενικές γραμμές, η μέθοδος προσδιορίζει αραιώσεις σε μια **πλάκα 12 βοθρίων**. Όταν υπάρχει υποψία για μεγαλύτερο αριθμό **από 500 cfu/gr**. *Salmonella*, είναι αναγκαίο να χρησιμοποιείται και μια **δεύτερη πλάκα** με 2 ml BPW ανά βοθρίο. Πρέπει να έχουμε τόσες αραιώσεις έτσι ώστε στην τελική σειρά βοθρίων της μικροπλάκας να υπάρχει αρνητικό αποτέλεσμα.

- 1) Μεταφορά στην πρώτη άδεια σειρά βοθρίων , χρησιμοποιώντας πιπέτα 2,5 ml από την αρχική αραιώση
- 2) Μεταφορά 0,5 ml (π.χ. χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα) σε κάθε βοθρίο από την πρώτη σειρά διαδοχικά στην δεύτερη σειρά με 2 ml BPW (πρώτη σειρά 1/5 αραιώση).
- 3) Μεταφορά 0,5 ml (με καινούρια ρύγχη) σε κάθε βοθρίο από την δεύτερη σειρά διαδοχικά στην τρίτη σειρά με 2 ml BPW (δεύτερη 1/5 αραιώση).
- 4) Πριν την μεταφορά του 0,5 ml από την 2^η στην 3^η σειρά, αναμειγνύεται το εναιώρημα των βοθρίων (προσεκτικά) αναρροφώντας και εκγχύοντας με την πιπέτα στα βοθρία.
- 5) Προχωρούμε με τον ίδιο τρόπο και στις άλλες σειρές.
- 6) Επωάζουμε την μικροπλάκα 12-βοθρίων στους 37 C για 18h.

Σημείωση 2:

Όταν το επίπεδο επιμόλυνσης του δείγματος είναι **άγνωστο** και συχνά χαμηλό, πρέπει να ελέγχουμε για την παρουσία *Salmonella* spp. στο δείγμα με την καλλιέργεια της **αρχικής** αραιώσης.

Για τον σκοπό αυτό, επωάζουμε την αρχική αραιώση στους 37 C για 18 2h . Οπότε και ενοφθαλμίζουμε ένα petri που περιέχει MSRVR με 0,1 ml επωασμένης καλλιέργειας της αρχικής αραιώσης

3 Εκλεκτικός εμπλουτισμός σε ημίρευστο άγαρ (MSRV)

Ενοφθαλμίζουμε τα βοθρία που περιέχουν 2 ml MSRV με 20 μl από τις καλλιέργειες π.χ. χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα. Χρήση καινούριων ρυγχών για κάθε σειρά βοθρίων.

Τοποθετούμε τα 20 μl καλλιέργειες BPW στην άκρη του βοθρίου και στη επιφάνεια του υποστρώματος

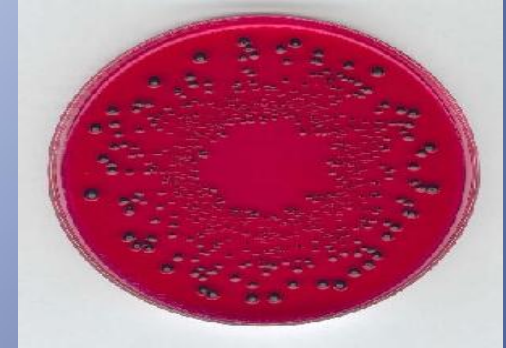
Όταν γίνεται η υποκαλλιέργεια από το BPW προσπαθούμε να μην το αναταράξουμε. Η μετακίνηση των μικροπλακών γίνεται προσεκτικά. Αποφεύγουμε το σχηματισμό σταγονιδίων στην επιφάνεια του MSRV (επιφανειακή τάση της καλλιέργειας).

Επωάζουμε την ενοφθαλμισμένη μικροπλάκα με MSRV στους 41,5 C για 24-3h. Δεν απορρίπτουμε τις πλάκες.

Υποπτα φαίνονται τα βοθρία με θολερή γκριζόασπρη ζώνη περιφερικά από την σταγόνα ενοφθαλμισμού. Η ζώνη θολερότητας χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη λευκής άλω με σαφή όρια.

Εάν τα τρυβλία πετρί εμφανίσουν αρνητικό αποτέλεσμα μετά από 24h επώασης, θα πρέπει να επωαστούν εκ νέου για επιπλέον 24h-3h.

4. Εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα



Υποκαλλιέργειες από τα ύποπτα βοθρία με MSR/V σε **XLD άγαρ** . Βυθίζεται κρίκος του 1μl μέσα στα όρια της αδιαφανούς ζώνης και ενοφθαλμίζετε αυτήν την καλλιέργεια στην επιφάνεια ενός κανονικού μεγέθους XLD.

Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία πετρί με XLD άγαρ επωάζονται στους 37 C για 24h - 3h. (Τα τρυβλία MSR/V με αρνητικό αποτέλεσμα επωάζονται σε κλίβανο θερμοκρασίας 41,5 C για επιπλέον διάστημα 24h - 3h)

Η διαδικασία του ενοφθαλμισμού των εκλεκτικών υποστρωμάτων επαναλαμβάνεται και μετά το δεύτερο 24ώρο της επώασης του MSR/V.

Οι τυπικές αποικίες Σαλμονέλλας στο XLD έχουν μαύρο κέντρο και ελαφρώς διάφανη ζώνη κόκκινου χρώματος, λόγω της αλλαγής του χρώματος του δείκτη

5. Βιοχημική και ορολογική ταυτοποίηση

Επιλογή αποικιών για ταυτοποίηση

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

Εφόσον υπάρχουν αποικίες (καθαρή καλλιέργεια) διαθέσιμες στο εκλεκτικό XLD άγαρ γίνεται απευθείας βιοχημική ταυτοποίηση των υπόπτων αποικιών. Παράλληλα με τις βιοχημικές δοκιμές ενοφθαλμίζεται σε μη εκλεκτικό υπόστρωμα (π.χ. NA) για ορολογικές δοκιμές και έλεγχο καθαρότητας.

Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία πετρί με (NA) επωάζονται στους 37 C για 24h 3h

A. Βιοχημική ταυτοποίηση

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 h.

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) βλέπε πίνακα 1.

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 h 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 h.

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

Κίτρινος χρωματισμός υποδεικνύει αρνητική αντίδραση.

Οι τυπικές καλλιέργειες Σαλμονέλλας δίνουν θετική αντίδραση

B. Ορολογική ταυτοποίηση και ορότυπος

Τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών μας δείχνουν ότι ένα απομονωθέν στέλεχος ανήκει στο γένος *Salmonella* .

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

Η **οροτυποποίηση** θεωρείται απαραίτητη για την ολοκλήρωση της ταυτοποίησης στελέχους *Salmonella* . 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.

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%)

10. Έκφραση αποτελεσμάτων

Καταμέτρηση του αριθμού των θετικών βοθρίων που δίνουν επιβεβαιωμένο αποτέλεσμα σε κάθε αραίωση.

Υπολογισμός MPN βάσει του αριθμού των θετικών επιβεβαιωμένων βοθρίων σε κάθε αραίωση.

Εάν όλα τα βοθρία είναι αρνητικά, αλλά η αρχική αραίωση (1/10 αραίωση) βρεθεί θετική για *Salmonella* spp. (μετά την επιβεβαίωση), το αποτέλεσμα αναφέρεται σαν: **παρουσία *Salmonella* spp.** στο ποσό του εξεταζομένου δείγματος(π.χ. 25 gr), αλλά λιγότερο από το χαμηλότερο όριο της mini – MPN δοκιμής (< 1cfu/gr) .

Για τον υπολογισμό του MPN, γίνεται χρήση των πινάκων MPN που βρίσκονται στην **ISO 7218.**

Καθώς δεν είναι γνωστοί διαθέσιμοι ως “ πρότυποι ” πίνακες MPN με τις αραιώσεις χρήσης.

Ένα πρόγραμμα με χρήση Excel λειτουργεί για να εξυπηρετήσει έως 10 σειρές αραιώσεων. Αυτό το πρόγραμμα συνιστάται να χρησιμοποιείται περισσότερο από άλλα επειδή τα αποτελέσματα σε ειδικούς συνδυασμούς εξαγονται με τρεις αραιώσεις και είναι ίδια με εκείνα των πινάκων της ISO 7218.

Το πρόγραμμα διατίθεται δωρεάν για εγκατάσταση από :

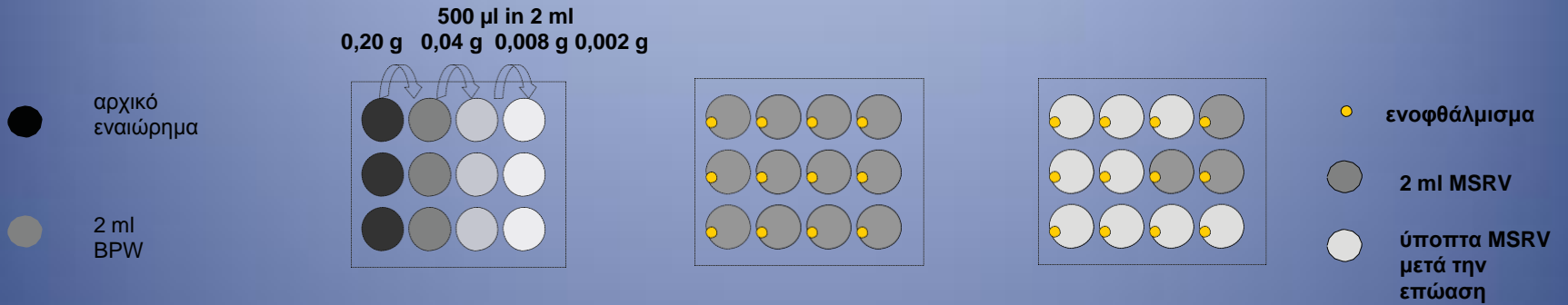
<http://www.wiwiss.fu-berlin.de/institute/iso/mitarbeiter/wilrich/index.html> .

Διάγραμμα μεθόδου mini-MSRV

Σειρές αραιώσεων και
προεμπλουτισμός σε BPW

Μεταφορά από προεμπλουτι-
σμό BPW (20 μl) στο MSRV

έλεγχος και επιλογή
υπόπτων MSRV



επώαση στους $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
για $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$

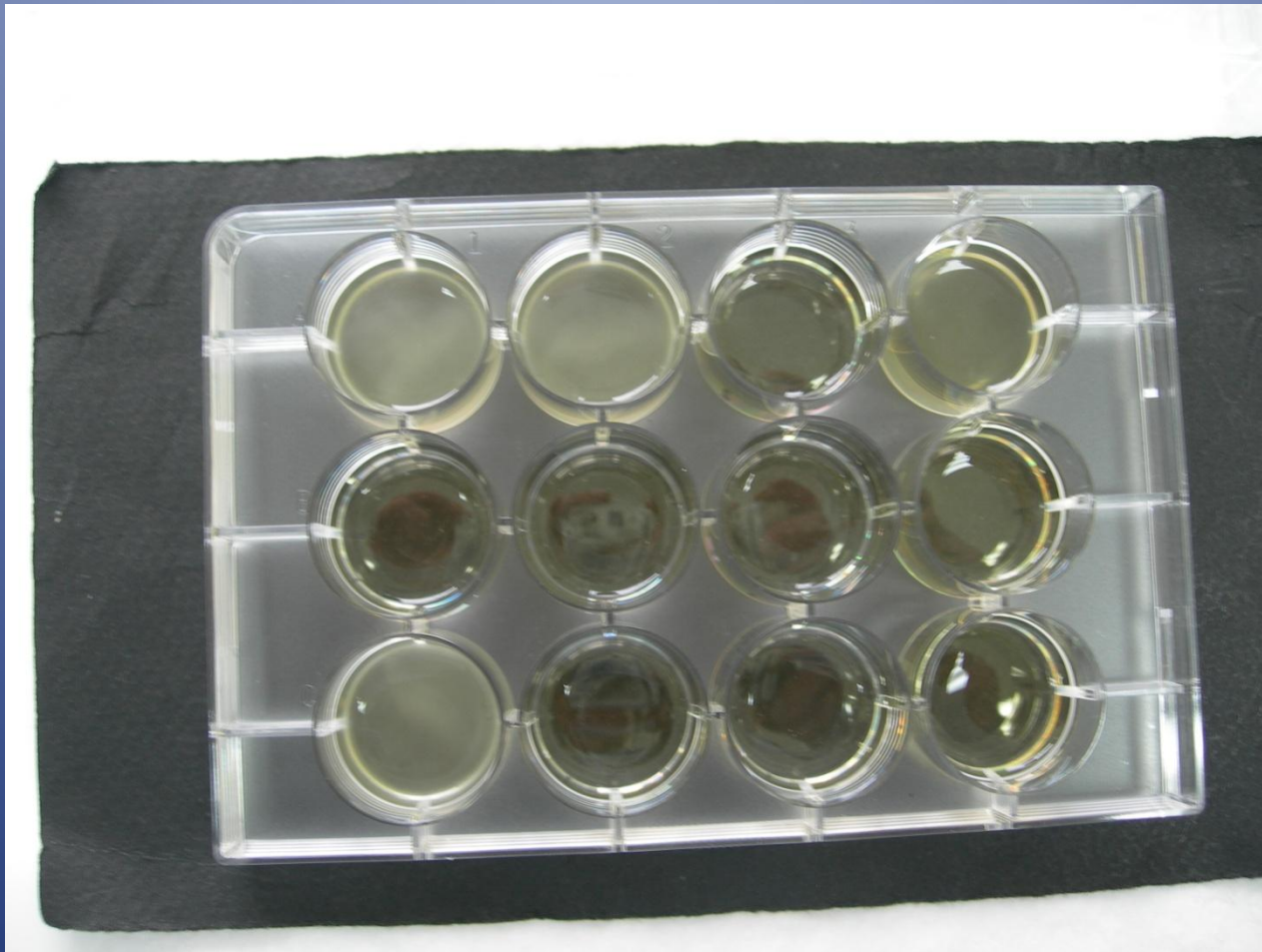
επώαση στους $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
για $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ αρνητικά βοθρία:
επώαση έως 48 h

καλλιέργειες από τα ύποπτα βοθρία
και τις διαδοχικές αραιώσεις στο
εκλεκτικό υπόστρωμα XLD
στους $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ for $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$

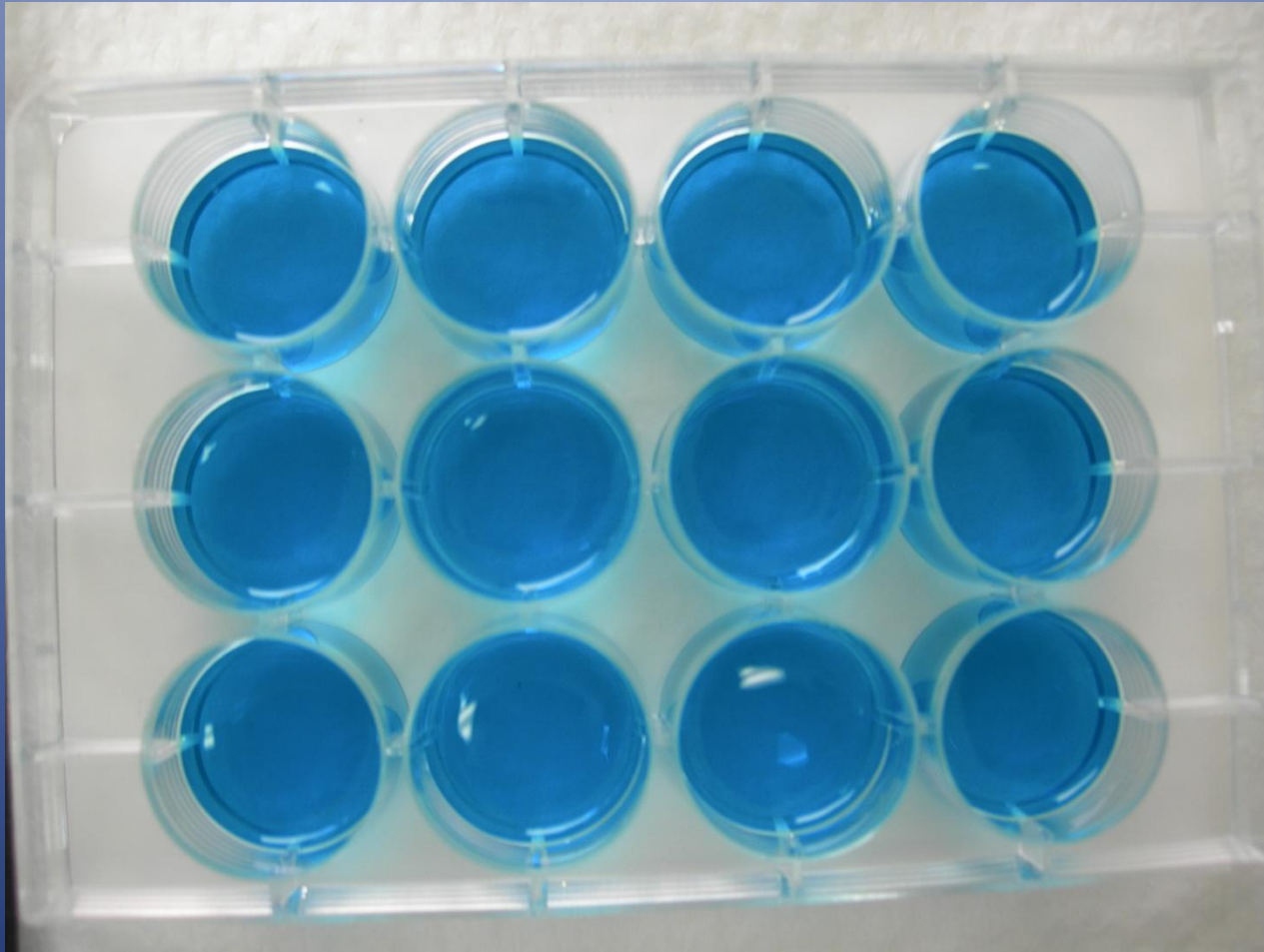
Βιοχημική ταυτοποίηση από τις
χαρακτηριστικές αποικίες από κάθε
υπόστρωμα XLD

Υπολογισμός

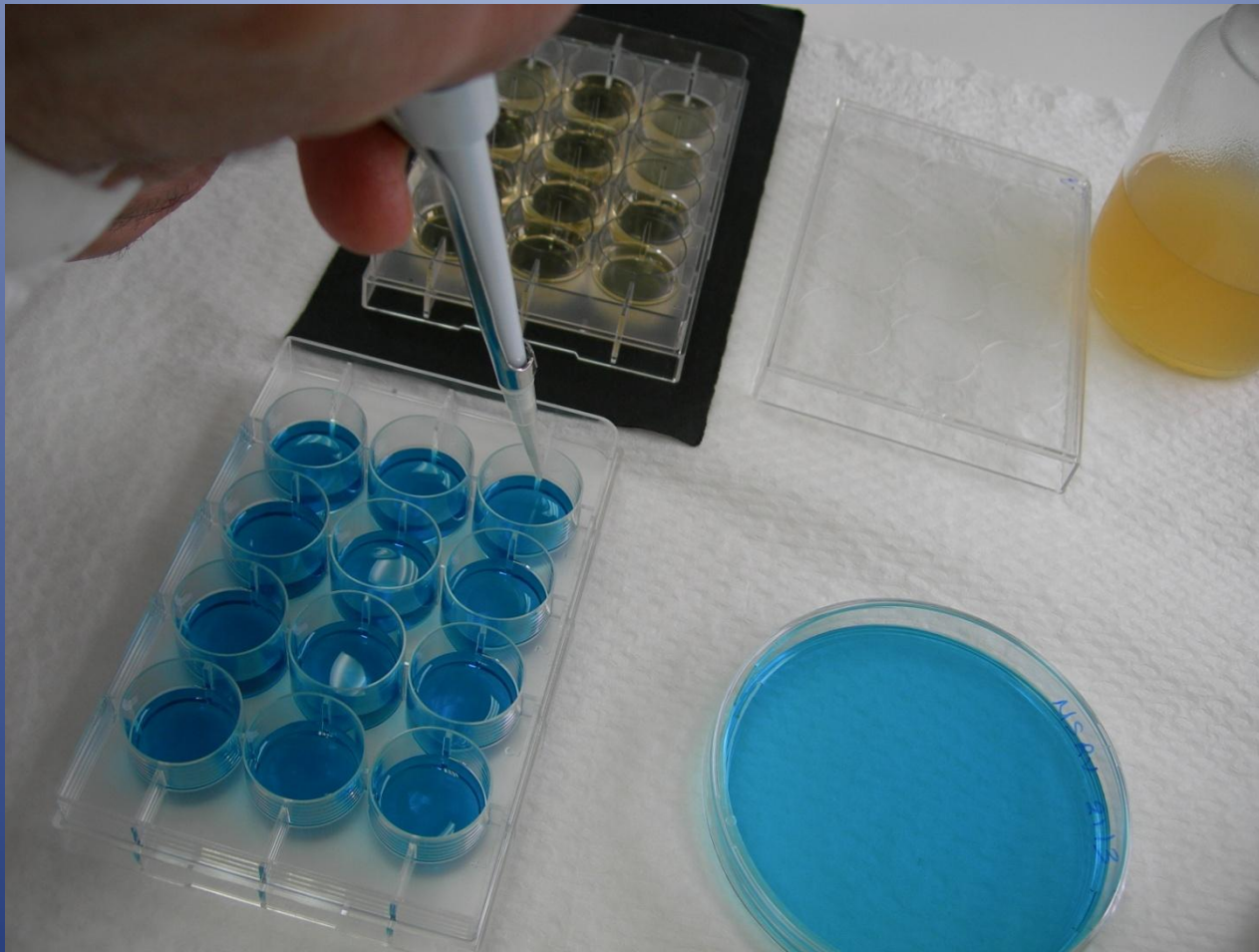
επωασμένο ΒΡω



MSRV προ ενοφθαλμισμού



ενοφθαλμισμός MSR/V



επωασμένο MSRν

