



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

ΟΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΩΝ

Αφροδίτη Π. Σμπιράκη DVM, PhD

Ταξινομική Ονοματολογία Σαλμονέλλας (nomenclature) / Γραφή

✓ **Οικογένεια:** *Enterobacteriaceae*

(πρώτο γράμμα κεφαλαίο, με πλάγια γράμματα)

✓ **Γένος:** *Salmonella*

(πρώτο γράμμα κεφαλαίο, με πλάγια γράμματα)

✓ **Είδος:** *enterica*

(πρώτο γράμμα μικρό, με πλάγια γράμματα)

✓ **Υποείδος:** *enterica (I)*

(πρώτο γράμμα μικρό, με πλάγια γράμματα)

Ορότυπος: π.χ. Enteritidis

(πρώτο γράμμα κεφαλαίο, όχι πλάγια γράμματα)

✓ **Λοιπά Υποείδη:** *salamae (II)*

arizonae (IIIa)

diarizonae (IIIb)

houtenae (IV)

indica (VI)

✓ **Είδος:** *bongori (V)*



Ταξινόμηση Σαλμονελλών

WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (i.e. Institut Pasteur, Paris, France)



- ✓ Η πιο πρόσφατη (9^η) έκδοση του σχήματος “*White-Kauffmann-Le Minor*” : 2007 (Grimont and Weill, 2007)

<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>

- ✓ Συμπληρωματικά έντυπα του Institut Pasteur με τυχόν νέους οροτύπους δημοσιεύονται στο «*Research in Microbiology*».

2610 ορότυποι (Guibourdenche, M. et al. 2010: Suppl. 2003-2007 (No 47) to the White Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology* 161, 26-29

Τι είναι η οροτυποποίηση;

- ✓ Α' γενιάς μέθοδος μικροβιακής τυποποίησης (1929)
- (*Salmonella*, *Shigella*, *Legionella*, *Streptococcus pneumoniae*)



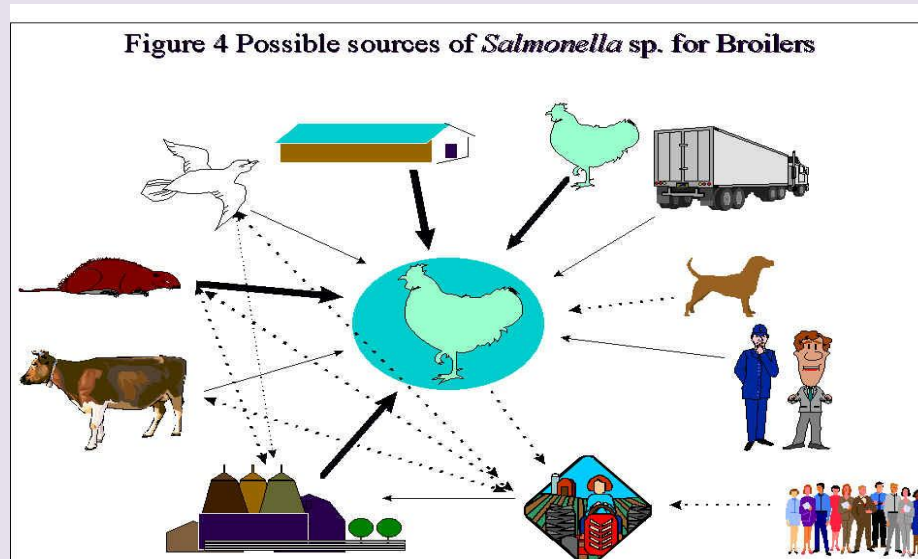
- ✓ Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των στελεχών, που βασίζεται στην αντιγονικότητα επιφανειακών δομών του μικροβιακού κυττάρου:



- Λιποπολυσακχαρίτη (σωματικά αντιγόνα – O)
- Βλεφαριδικής πρωτεΐνης (βλεφαριδικά αντιγόνα – H)

Σε τι χρησιμεύει η οροτυποποίηση;

- ✓ Διεθνής επιστημονική «γλώσσα»
- ✓ Συσχέτιση ορότυπου με νόσο και με «ξενιστή»
- ✓ Επιδημιολογική ταξινόμηση των στελεχών
- ✓ Απαραίτητη για τη διερεύνηση επιζωοτιών / επιδημιών



Διεθνές Πρότυπο για την οροτυποποίηση



ISO/TR 6579-3:

Microbiology of food and animal feed-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – **Part 3**, Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp.

DRAFT (5), από 03/2013 : ISO WG10

Προσδιορισμός ορότυπου Σαλμονέλλας

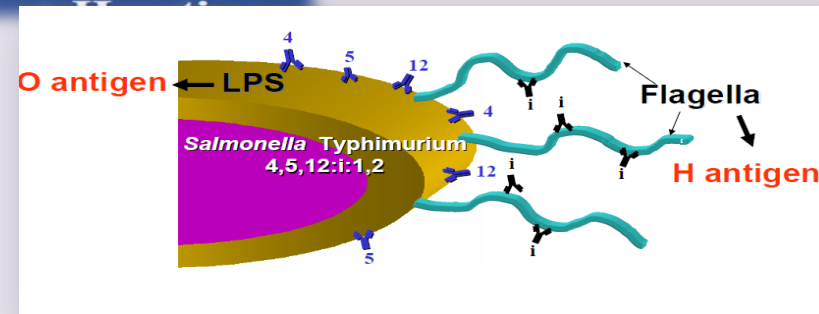
Ο προσδιορισμός του ορότυπου Σαλμονέλλας βασίζεται στον προσδιορισμό της αντιγονικής σύνθεσης (i.e. συνδυασμός αριθμών και γραμμάτων): **Σωματικών (O)** και **Βλεφαριδικών αντιγόνων (H)**

(Αντιγόνα κάψας, Vi για τη *S. Dublin*, *S. Typhi*, *S. Paratyphi*)

Salmonella Typhimurium
"Group O:4" or "Group B"
I 4, [5], 12 : i : 1,2
Subspecies O antigen Phase 1 Phase 2

Μπορεί να υπάρχει ή όχι

CDC, P. Fields



Σωματικά αντιγόνα: Enterobacteriaceae (*Salmonella*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*)

Βλεφαριδικά αντιγόνα: ειδικά, για τη *Salmonella*




Μέθοδος προσδιορισμού: ταχεία οροσυγκόλληση

Ταχεία οροσυγκόλληση σε πλάκα του εξεταζόμενου στελέχους με γνωστούς πολυειδικούς και μονοειδικούς αντιορούς σαλμονελλών για τα σωματικά και βλεφαριδικά αντιγόνα.

Εξοπλισμός

- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Λύχνος bunsen
- Τρυβλία Petri πλαστικά αποστειρωμένα διαμέτρου 60mm και 90 mm
- Αυτόκαυστο
- Μικροβιολογικοί κρίκοι μεταλλικοί, διαμέτρου 5-10 μl και πλαστικοί μίας χρήσης 10 & 1 μl
- Υδατόλουτρο
- Επωαστικός κλίβανος $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Βαθεία κατάψυξη -70°C έως -80°C
- Cryovials 2 ml

Θρεπτικά υλικά

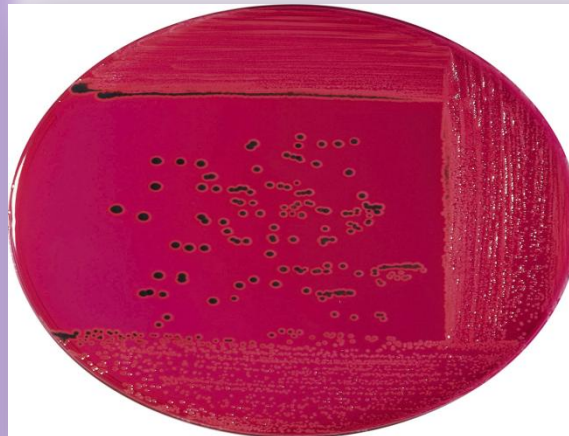
- Nutrient agar: NA (έτοιμη σκόνη)
 - Αντιοροί Σαλμονέλλας
 - Φυσιολογικός ορός με 0,85% έως και 3,5% NaCl
 - Sven Gard agar (παρασκευή από πρώτες ύλες)
 - Nutrient broth (έτοιμο υπόστρωμα σε σκόνη) + 15% glycerol
- 

Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

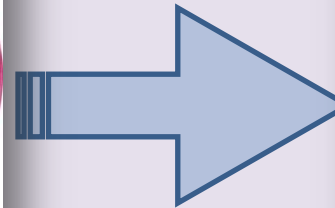
ΔΕΙΓΜΑ ΥΠΟ ΕΞΕΤΑΣΗ

- ✓ Το δείγμα παραλαμβάνεται ως καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα εκλεκτικό ή κοινό, κατά προτίμηση σε στήλη nutrient agar.
- ✓ Ανακαλλιεργείται σε τρυβλίο πετρί με nutrient agar και αν χρειαστεί και σε εκλεκτικά υποστρώματα (XLD ή/και BG ή/και RA) για να διαπιστωθεί η καθαρότητα της καλλιέργειας, ώστε να λάβουμε καθαρή **μεμονωμένη** ύποπτη αποικία σαλμονέλλας για τη δοκιμή.
- ✓ ΠΡΟΣΟΧΗ: προφυλάξεις για το χειρισμό παθογόνων μικροβίων

XLD Agar



Nutrient Agar

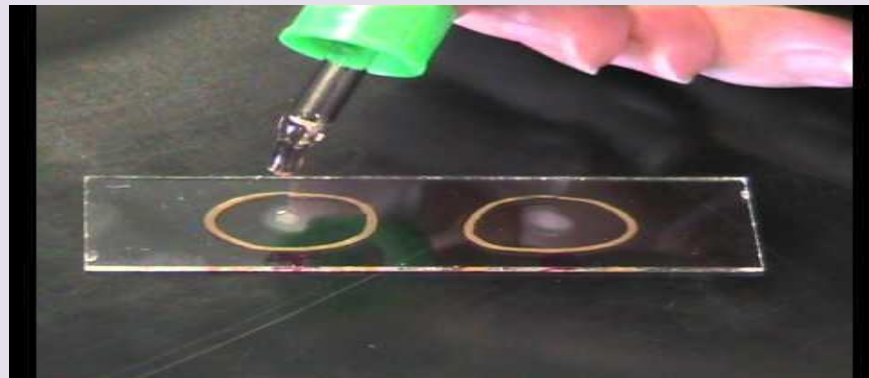


Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

1^ο βήμα

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΥΤΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ

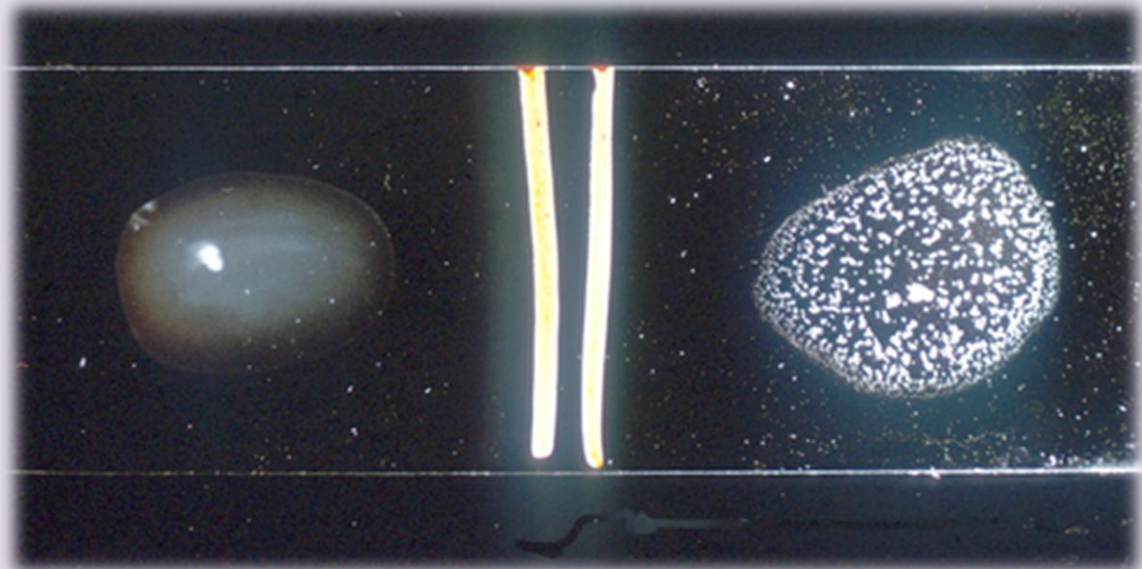
- ✓ Με τη χρήση κρίκου ενοφθαλμισμού παρασκευάζεται **ομοιογενές, πυκνό μικροβιακό εναιώρημα** σε σταγόνα αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού. Ανακινείται η πλάκα με ήπιες κινήσεις για 5-60 δευτερόλεπτα. Παρατηρείται το αποτέλεσμα με γυμνό οφθαλμό έναντι **σκουρόχρωμου πεδίου** ή με τη βοήθεια μεγεθυντικού φακού. Αν τα βακτήρια έχουν συσσωματωθεί σε λιγότερο ή περισσότερο ευδιάκριτες μονάδες το στέλεχος θεωρείται **ΑΥΤΟΣΥΓΚΟΛΛΩΜΕΝΟ** και θα πρέπει να εξετάζεται με άλλες μεθόδους.
- ✓ Σε περίπτωση **αρνητικής αντίδρασης**, συνεχίζουμε για την εύρεση των σωματικών και βλεφαριδικών αντιγόνων.



Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

1^ο βήμα

ΕΛΕΓΧΟΣ (ΑΥΤΟ) ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ



ΑΡΝΗΤΙΚΟ

ΘΕΤΙΚΟ

Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

- ✓ Στο εμπόριο διατίθενται αρκετοί τύποι συγκολλητικών ορών που περιέχουν αντισώματα για ένα ή περισσότερα Ο-αντιγόνα (μονοδύναμος ή πολυδύναμος αντι-Ο ορός) και αντι-οροί που περιέχουν αντισώματα για ένα ή περισσότερα Η- αντιγόνα (πολυδύναμος ή μονοδύναμος αντι-Η ορός).
- ✓ Η κάθε εταιρία παράγει τις δικές της σειρές αντιορών με διαφορετική σύνθεση και ειδικές οδηγίες χρήσης που πρέπει να έχουν υπόψη και να ακολουθούν οι αναλυτές κατά την τέλεση της δοκιμής.



Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

2^ο βήμα

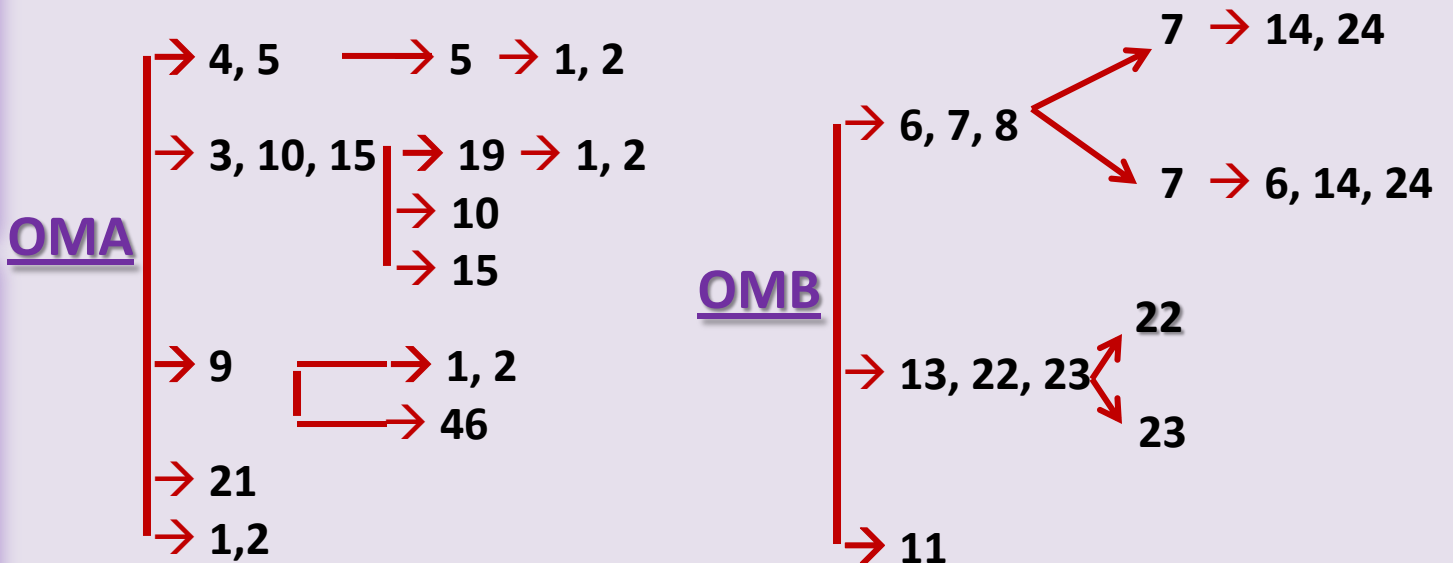
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ

- ✓ Παρασκευάζεται μικροβιακό εναιώρημα σε πλάκα χρησιμοποιώντας πολυδύναμο Ο- αντιορό, αντί του φυσιολογικού ορού, και την προβλεπόμενη αλληλουχία μονοδύναμων αντιορών στη συνέχεια σε περίπτωση θετικής αντίδρασης.
- ✓ Αν η αντίδραση είναι αρνητική γίνεται έλεγχος με τον αντιορό **Vi** για ύπαρξη **αντιγόνων κάψας**. Σε περίπτωση θετικής αντίδρασης παρασκευάζεται πυκνό κυτταρικό εναιώρημα σε δοκιμαστικό σωλήνα, θερμαίνεται στους 100°C για μία ώρα και επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία.
- ✓ Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την εύρεση των σωματικών αντιγόνων που καθορίζουν την οροομάδα (Group) σύμφωνα με το σχήμα **White- Kauffmann-Le Minor**.

Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

2^ο βήμα

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ



OMC	→	16	→	17	→	18	→	28	→	30	→	35	→	38
OMD	→	39	→	40	→	41	→	42	→	43	→	44	→	45
OME	→	47	→	48	→	50	→	51	→	52	→	53	→	61
OMF	→	54	→	55	→	56	→	57	→	58	→	59		
OMG	→	60	→	62	→	63	→	65	→	66	→	67		

Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

3^ο βήμα

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΛΕΦΑΡΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ (Α)

- ✓ Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για την ανίχνευση των βλεφαριδικών αντιγόνων με τη χρήση πολυδύναμων και μονοδύναμων Η-αντιορών μέχρι να βρεθούν τα αντιγόνα των μαστιγίων της μιας φάσης (συνήθως της **1^{ης} φάσης**), οπότε και εκδηλώνεται θετική αντίδραση σε συγκεκριμένους μονοδύναμους Η-αντιορούς.
- ✓ Στην περίπτωση των **μονοφασικών** σαλμονελλών η διαδικασία ολοκληρώνεται εδώ, και καθορίζεται ο ορότυπος σύμφωνα με το σχήμα White- Kauffmann-Le Minor (π.χ. *S. Paratyphi A*, *S. Typhi*, *S. Derby*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*).

Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

3^ο βήμα

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΛΕΦΑΡΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ (A)

HMA

- a
- b
- c
- d
- i
- z10
- z29

HMB

- E
 - h
 - (En)
 - x
 - z15
- G → gm → m → gp → p → f → s → t
 - u
 - q

HMC

- y
- r
- L
 - v
 - w
 - z13
 - z28
- k
- z4
- z

H1

- 2
- 5
- 6
- 7
- z6

Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

3^ο βήμα

ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Εάν το στέλεχος δεν έχει κινητικότητα
Ενοφθαλμίζουμε τρυβλίο πετρί με 6 ml Sven Gard Άγαρ.
(επωάζουμε στους $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, για 18 ± 3 ώρες)

Sven Gard Agar - Υλικά

- ✓ Trypto-casein Soya Broth (TSB) 1000ml
- ✓ Natriumdexocholat($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$) 0.3g
- ✓ Agar 4,5g

Sven Gard Agar - Παρασκευή

- ✓ pH:7,4 $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ στους 25°C
- ✓ Μοιράζεται σε φιαλίδια ανά 6 ml, 12 ml, 18 ml, 30 ml.
Αποστείρωση σε Αυτόκαυστο στους 110°C για 15 λεπτά
- ✓ Αποθήκευση έως 3 μήνες στους $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

Προετοιμασία των τρυβλίων με Sven Gard : Μοιράζεται ποσότητα 6 ml σε τρυβλία πετρί διαμέτρου 60mm την ημέρα της χρήσης.

Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

4^ο βήμα

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΛΕΦΑΡΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ (B)

Τα περισσότερα στελέχη είναι **διφασικά**. Για την ανίχνευση της 2^{ης} φάσης, προβαίνουμε σε **δέσμευση της φάσης που ανιχνεύθηκε**, ενοφθαλμίζοντας με το υπό εξέταση στέλεχος το κέντρο τρυβλίων πετρί με 6 ml

Sven Gard Άγαρ, προετοιμασμένα για

αναστροφή φάσης



Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

4^ο βήμα

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΛΕΦΑΡΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ (B)

Προετοιμασία των τρυβλίων για αναστροφή φάσης

- ✓ Για κάθε 6 ml υποστρώματος Sven προστίθεται ποσότητα 10 ml περίπου αντιορού, αντίστοιχου της φάσης που έχει ανιχνευθεί,
 - είτε απευθείας σε κενό τρυβλίο, όπου προστίθεται εν συνεχεία το υπόστρωμα σε κατάλληλη θερμοκρασία. Ανακινείται το τρυβλίο για ενσωμάτωση και αφήνεται να στερεοποιηθεί.
 - είτε απευθείας στο φιαλίδιο, όπου προστίθεται η ποσότητα αντιορού που αντιστοιχεί στην ποσότητα του υποστρώματος στο φιαλίδιο. Ανακινείται καλά και μοιράζεται στο/α τρυβλίο/α.
- ✓ Πριν τη χρήση τα τρυβλία αφήνονται να στεγνώσουν κλειστά στο θάλαμο νηματικής ροής για 5 λεπτά και δεν αναστρέφονται.
- ✓ Επωάζουμε στους $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, για 18 ± 3 ώρες.
- ✓ Μετά το πέρας της επώασης, επαναλαμβάνεται η διαδικασία ΤΟΠ παίρνοντας καλλιέργημα από το πιο απομακρυσμένο σημείο (περιφέρεια) της ανάπτυξης στο τρυβλίο Sven Gard .
- ✓ Με την ανίχνευση και της 2^{ης} φάσης η διαδικασία προσδιορισμού της αντιγονικής σύνθεσης ολοκληρώνεται .

Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

Φύλλο οροτυπίας

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΑΛΚΙΔΑΣ
ΦΥΛΛΟ ΟΡΟΤΥΠΙΑΣ

Κ. Α. Δ: _____ Ημ/νία Έναρξης: _____ Αυτοσυγκολλώμενο: _____ Poly O: _____ Poly H: _____ Vi: _____

O - ANTIGENS											
Ημ/νία:											Αποτέλεσμα
OMA	4	5	9	12	46						
OMB	6,7,8	6	7	8							
OMC											
OMD											

H - ANTIGENS / 1 ^η Φάση											
Ημ/νία:											Αποτέλεσμα
HMA	Z10	i									
HMB	e	h	x	g	m	q	s	t			
HMC	r										
HMD	HMIII										
H1+z6	2	5									

H - ANTIGENS / 2 ^η Φάση											
Ημ/νία:											Αποτέλεσμα
HMA	Z10	i									
HMB	e	h	x	g	m	q	s	t			
HMC	r										
HMD	HMIII										
H1+z6	2	5									

+ : θετικό
- : αρνητικό

ΑΝΑΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ		
Ημ/νία	Υλικά	Παρατηρήσεις

ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ			
Υλικά	Θ	A	Παρατηρήσεις

Παρατηρήσεις:

Ορότυπος:

Ημ/νία τέλους:

Αναλυτής / Υπογραφή :

Μέθοδος ταχείας οροσυγκόλλησης σε πλάκα

ΑΚΙΝΗΤΕΣ ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΕΣ

Salmonella Gallinarum βióτυπος Gallinarum

Salmonella Gallinarum βióτυπος Pullorum

Αντιγονική σύνθεση: 9,12 : - : -

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Pullorum</i>
Ornithine	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
Dulcitol	ΘΕΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ

Σχηματική απεικόνιση οροτυποποίησης των 5 σημαντικότερων ορότυπων για τη δημόσια υγεία



O:4	O:9	O:7	O:7	O:8
↓	↓	↓	↓	↓
+	+	+	+	+
↓	↓	↓	↓	↓
(O:5→+ή-)	H:G ή H:g	H:r	H:r	H:z10
↓	↓	↓	↓	↓
↓	+	+	+	+
H:i	↓	↓	↓	↓
↓	H:m	H:2	H:2	H:x
+	↓	↓	↓	↓
↓	+	+	-	+
H:2	↓	↓	↓	↓
↓	H:q, H:s, H:t	H:5	H:5	O:6 (O:6, O:6,7 ή O:6,14,24)
+	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓
↓	-	-	+	+
↓	↓	↓	↓	↓
↓	O:46	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓
↓	-	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓
Salmonella ser. Typhimurium	Salmonella ser. Enteritidis	Salmonella ser. Virchow	Salmonella ser. Infantis	Salmonella ser. Hadar



ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΕΙΔΟΥΣ-ΥΠΟΕΙΔΟΥΣ *SALMONELLA* spp.

π.χ.

44: z4, z24:-

***S. Christiansborg* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*)**

ή

Salmonella enterica* subsp. *arizonae

ή

Salmonella enterica* subsp. *houtenae



Βιοχημική διάκριση είδους και υποείδους Σαλμονελλών

Differential characters of *Salmonella* species and subspecies

Species	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
Subspecies	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Characters							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Growth with KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartrate ^(a)	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
γ-glutamyltransferase	+ ^(*)	+	-	+	+	+	+
β-glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	- (70%)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	- (75%)	+ (75%)	-	d	-
Lysed by phage O1	+	+	-	+	-	+	d
Usual habitat	Warm-blooded animals		Cold-blooded animals and environment				

(a) = *d*-tartrate.

(*) = Typhimurium d, Dublin -.

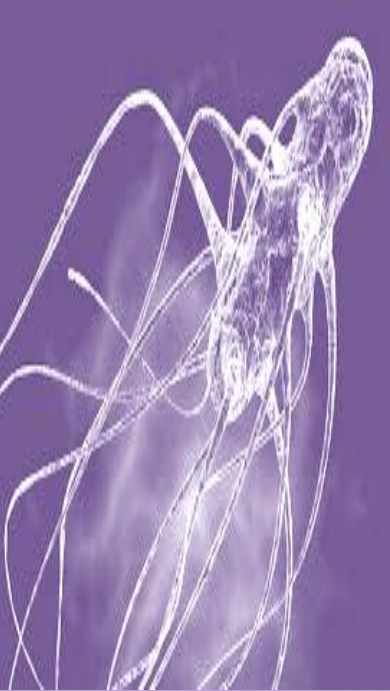
+ = 90 % or more positive reactions.

- = 90 % or more negative reactions.

d = different reactions given by different serovars.

L. Le Minor, M. Véron, M. Popoff. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1982, **133 B**, 223-243 and 245-254.

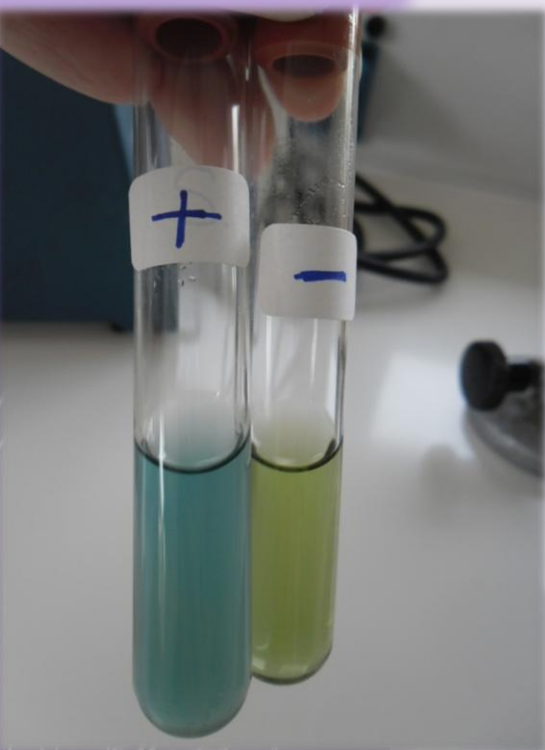
L. Le Minor, M.Y. Popoff, B. Laurent, D. Hermant. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, 1986, **137 B**, 211-217.



Βιοχημική διάκριση είδους και υποείδους Σαλμονελλών

ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ → **Malonate Broth**

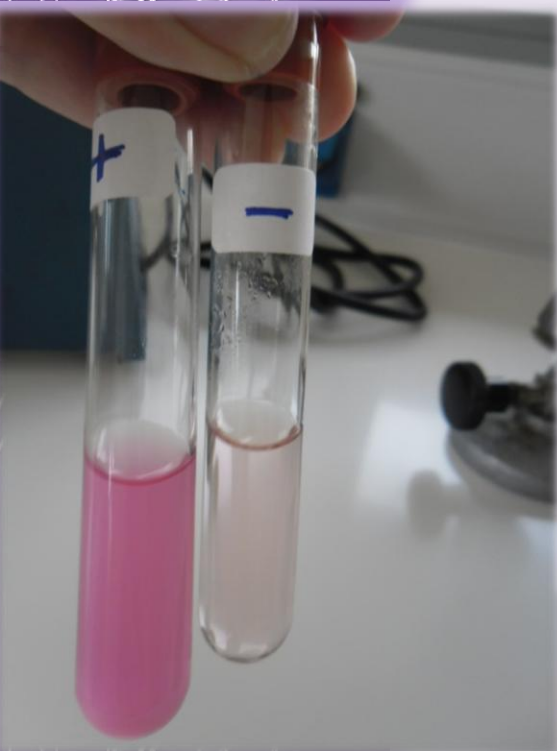
- ✓ Ενοφθαλμίζεται σωλήνας με malonate broth από φρέσκια καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε nutrient agar.
- ✓ Επώαση στους 37°C και παρατήρηση του αποτελέσματος στις 24 και 48 ώρες.
- ✓ Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος (όξινο pH) το χρώμα του υποστρώματος από πράσινο μεταβάλλεται σε μπλε.
- ✓ Ως θετικό μάρτυρα μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε *Salmonella enterica* subsp. *Salamae* (S II) και ως αρνητικό μάρτυρα ένα ανεμβολίαστο σωληνάριο με Malonate broth.





Βιοχημική διάκριση είδους και υποείδους Σαλμονελλών

ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ → **Dulcitol Broth**



- ✓ Ενοφθαλμίζεται σωλήνας με ζωμό dulcitol από φρέσκια καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε nutrient agar.
- ✓ Επώαση στους 37°C και παρατήρηση του αποτελέσματος στις 24 και 48 ώρες.
- ✓ Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, συντελείται αλλαγή χρώματος του Dulcitol broth σε ροζ. Η αρνητική δοκιμή υποδηλώνεται με διατήρηση του χρώματος του Dulcitol.
- ✓ Ως θετικό μάρτυρα μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε *Salmonella* Enteritidis και ως αρνητικό μάρτυρα ένα ανεμβολίαστο σωληνάριο με ζωμό dulcitol.



Βιοχημική διάκριση είδους και υποείδους Σαλμονελλών

ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ → **d-Tartrate Broth**

- ✓ Ενοφθαλμίζεται σωλήνας με d-tartrate broth από φρέσκια καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε nutrient agar.
 - ✓ Επώαση στους 37°C για 24 ώρες.
 - ✓ Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα οξικού μολύβδου σε ποσότητα 0,5 ml, τόσο στον ενοφθαλισμένο σωλήνα όσο και σε έναν σωλήνα-μάρτυρα.
 - ✓ Θετικό αποτέλεσμα θεωρείται αυτό κατά το οποίο το ύψος του ιζήματος στον ενοφθαλισμένο σωλήνα είναι μικρότερο από αυτό του μάρτυρα.
 - ✓ Ως θετικό μάρτυρα μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε *Salmonella* Enteritidis και ως αρνητικό μάρτυρα ένα ανεμβολίαστο σωληνάριο με d-tartrate broth.
- Χρησιμοποιείται και για την διάκριση της *S. Paratyphi B* και *S. Paratyphi B* βιότυπος Java





Ολοκλήρωση προσδιορισμού ορότυπου Σαλμονέλλας

Με τον καθορισμό του αντιγονικού τύπου (σωματικά αντιγόνα και τα αντιγόνα των μαστιγίων 1^{ης}, 2^{ης} φάσης) και την πραγματοποίηση των βιοχημικών δοκιμών όπου απαιτούνται, καθορίζεται πλήρως ο ορότυπος της σαλμονέλλας, σύμφωνα με το σχήμα White-Kauffmann-Le Minor.



Προβλήματα – διορθωτικές ενέργειες

TROUBLE
AHEAD

✓ Δεν ανιχνεύονται τα σωματικά αντιγόνα

- έλεγχος για Vi αντιγόνο
- έλεγχος μετά από αναστολή των βλεφαριδικών αντιγόνων
- έλεγχος αντιορών με επιβεβαιωμένα στελέχη

✓ Δεν ανιχνεύονται τα βλεφαριδικά αντιγόνα

- ενοφθαλμισμός σε Sven Gard agar μέχρι 3 φορές
- έλεγχος αντιορών με επιβεβαιωμένα στελέχη

✓ Δεν ανιχνεύονται τα βλεφαριδικά αντιγόνα της 2^{ης} φάσης

- επανάληψη της διαδικασίας αναστροφής μέχρι 3 φορές
- έλεγχος αντιορών με επιβεβαιωμένα στελέχη

Αν δεν είναι δυνατό να καθορισθεί ο ορότυπος σύμφωνα με το σχήμα *White- Kauffmann-Le Minor*, γίνεται προσδιορισμός του είδους και υποείδους καθώς και της αντιγονικής σύνθεσης έως το σημείο που καθίσταται δυνατό και στο Πιστοποιητικό Δοκιμής το στέλεχος αναφέρεται σαν **ατυποποίητο**.

Εξωτερικός & εσωτερικός έλεγχος ποιότητας

- ✓ **Διεργαστηριακές δοκιμές (EURL-Salmonella, WHO).**
- ✓ Για τον **εσωτερικό έλεγχο ποιότητας** ακολουθείται η διαδικασία οροτυποποίησης με επιβεβαιωμένα στελέχη *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Virchow* & *S. enterica* subsp. *salamae*, (EURL-Salmonella) από την Τράπεζα φύλαξης στελεχών του εργαστηρίου και τους ομόλογους αντιορούς.
- Τα στελέχη εξετάζονται στην αρχή του μήνα, ένα κάθε φορά και με την σειρά που αναφέρονται, ώστε το κάθε στέλεχος να εξετασθεί 2 φορές σε ένα έτος.



Φύλαξη στελεχών σε “τράπεζα”

- ✓ Μετά το πέρας της οροτυπίας τα στελέχη φυλάσσονται στη βαθειά κατάψυξη, -70°C έως -80°C .



❖ 4955 ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΡΑΠΕΖΑΣ

- ✓ Από την καλλιέργεια σε N.A. γίνεται με τη βοήθεια κρίκου 10μl παχύ εναιώρημα του στελέχους σε cryovial με 1 ml Nutrient broth ή T.S. broth που περιέχει 15% glycerol.



Άλλες φαινοτυπικές μέθοδοι τυποποίησης


✓ **ΒΙΟΤΥΠΙΑ**

✓ **ΛΥΣΙΤΥΠΙΑ**

✓ **ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**



❖ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ/ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ:

- 
- ΜΙΚΡΗ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΛΟΓΩ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗΣ ΚΑΠΟΙΩΝ ΟΡΟΤΥΠΩΝ/ ΛΥΣΙΤΥΠΩΝ
 - ΜΕΤΑΒΛΗΤΑ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
 - ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΜΕΓΑΛΗ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ
 - ΕΠΙΠΟΝΕΣ
 - ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης - I

- ✓ Ανίχνευση, καταγραφή, αξιολόγηση διαφορών γενετικού υλικού υπό μελέτη μικροοργανισμών.
- ✓ Χρήσιμα τυποποιητικά σχήματα είναι αυτά με ικανότητα αποθήκευσης σε ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων, προσβάσιμες στη διεθνή επιστημονική κοινότητα.

ΟΜΩΣ..... ΚΟΣΤΟΣ, ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ, ΧΡΟΝΟΒΟΡΕΣ



- Η επιλογή μεθόδου εξαρτάται από το προς εξέταση μικρόβιο, τα γενετικά και πληθυσμιακά χαρακτηριστικά του, τα επιδημιολογικά θέματα που εγείρει κοκ.
- Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου τυποποίησης εξαρτάται από την αξία του επιφερόμενου αποτελέσματος στη λήψη μέτρων και στην επίλυση του προβλήματος.



Salmonella enterica subsp. *enterica*
4, [5], 12: i : - ατυποποίητη

Ή

Μονοφασική
Salmonella Typhimurium



- Πολυανθεκτικός ορότυπος (4/5 ΑΜΠ)
- Άνθρωποι, ζώα, Τροφ. Ζ. Π.
- 4^{ος} σε συχνότητα απομόνωσης στα καταγεγραμμένα κρούσματα Σαλμονέλλωσης στον άνθρωπο (2010)



Η Οροτυποποίηση δεν ενέχει **τελική** διαγνωστική αξία, απαιτείται εφαρμογή μοριακής μεθόδου.

Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης - II

- ✓ **ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PFGE)**
- ✓ **ΤΥΠΟΠΟΙΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ PCR**
- ✓ **ΡΙΒΟΤΥΠΙΑ**
- ✓ **ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ**
- ✓ **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΕΝΟΣ (SLST) Ή ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ (MLST) ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΟΠΩΝ**



Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης - III

DG-SANCO: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΣΕΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ (ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ 2012)

ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΑ – ΖΩΑ: **EFSA**



ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ: **ECDC**

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PFGE)



...ευχαριστώ για την προσοχή σας...



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΟΤΥΠΙΑΣ Κτ.Ε.Χ.



SALMONELLA

(aka SALMONELLA)

