

ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΤΗΣ 25ΗΣ ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 1990

ΠΡΟΕΔΡΙΑ ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΒΛΑΧΟΥ

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ.— **Ἀπομόνωση Σαλμονελλῶν μετὸ ἐμπλουτιστικὸ ὕλικὸ Rappaport-Vassiliadis, ἀπὸ παστεριωμένο γάλα πειραματικῶς μολυνθέν, ὑπὸ Π. Βασιλειάδη, Β. Καλαποθάκη, Δ. Τριχοπούλου*, διὰ τοῦ Ἀκαδημαϊκοῦ κ. Πέτρου Βασιλειάδη.**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ἀποτελέσματα πολλῶν μελετῶν ἀπὸ διάφορους ἐρευνητὲς ἔχουν δείξει ὅτι τὸ ἐμπλουτιστικὸ ὕλικὸ Rappaport-Vassiliadis (RV) ὑπερτερεῖ τοῦ τετραθειονικοῦ ζωμοῦ (TT) ὅσον ἀφορᾷ τὴν ἀπομόνωση σαλμονελλῶν ἀπὸ φυσικῶς μολυσμένα δείγματα (Beckers καὶ συν., 1987, Vassiliadis, 1983). Στὰ δείγματα αὐτὰ περιλαμβάνονταν πολλὰ εἶδη τροφίμων, κυρίως ζωικῆς προελεύσεως, ἐκτὸς ἀπὸ παστεριωμένο γάλα, ἐπειδὴ σπάνια ἐμφανίζει φυσικὴ μόλυνση μετὰ σαλμονέλλες. Τὰ τελευταῖα χρόνια στὴν Ὀλλανδία (Northolt καὶ συν., 1985) καὶ στὴν ΗΠΑ (Wilson καὶ συν., 1988) ἔγιναν μελέτες γιὰ τὴν ἀπομόνωση σαλμονελλῶν ἀπὸ γαλακτοκομικὰ προϊόντα μετὰ βασικὸ σκοπὸ τὸν προσδιορισμὸ τοῦ πλέον κατάλληλου ἐμπλουτιστικοῦ ὕλικου γιὰ τὴν ἀνίχνευση τῶν σαλμονελλῶν. Στὰ πλαίσια αὐτῆς τῆς ἐρευνητικῆς δραστηριότητος στὴν παρούσα ἐργασία ἔγινε σύγκριση τῆς ἀποτελεσματικότητος τῶν δύο ἐμπλουτιστικῶν ὕλικῶν RV καὶ TT. Ὁ ἔλεγχος πραγματοποιήθηκε σὲ δείγματα παστεριωμένου πλήρους γάλακτος, τεχνητῶς μολυνθέντα.

* P. VASSILIADIS, V. KALAPOTHAKI, D. TRICHOPOULOS, **Isolation of Salmonella from fluid milk with the use of Rappaport-Vassiliadis medium.**

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Ἀπὸ τὸν Ὀκτώβριο τοῦ 1989 μέχρι τὸν Ἀπρίλιο τοῦ 1990 ἐξετάστηκαν 100 δείγματα παστεριωμένου πλήρους γάλακτος, τεχνητῶς μολυνθέντα ὡς ἐξῆς. Δύο ἴσες ποσότητες (25 ml) γάλακτος ἀπὸ κάθε δείγμα μολύνονταν μὲ δύο διαφορετικούς τρόπους: ἡ πρώτη μὲ κάψουλες ζελατίνης ποὺ περιεῖχαν πρότυπο στέλεχος *S. typhimurium*, ἐνῶ ἡ δεύτερη μὲ τὸ ἴδιο στέλεχος σαλμονέλλας καὶ ἐπὶ πλέον δύο στελέχη ἀνταγωνιστικῶν μικροοργανισμῶν. Τὰ ἀνταγωνιστικὰ μικρόβια ἦταν Gram ἀρνητικοὶ μικροοργανισμοὶ (Enterobacteriaceae καὶ Pseudomonas) καὶ καθένας ἀπ' αὐτοὺς χρησιμοποιήθηκε μόνο μιὰ φορά γιὰ ἐπιμόλυνση δείγματος. Οἱ κάψουλες ζελατίνης περιεῖχαν 0.2g σκόνης γάλακτος μολυσμένης μὲ ἐξασθενημένο στέλεχος τῆς *S. typhimurium* καὶ μὲ μέσο ἀριθμὸ σαλμονελλῶν κατὰ κάψουλα 5.0 (Beckers καὶ συν., 1985). Ὁ ἀριθμὸς τῶν ἀνταγωνιστικῶν μικροοργανισμῶν ποὺ προσετίθετο σὲ κάθε δείγμα παρεῖχε ἀνάπτυξη 5-100 ἀποικιῶν σὲ καλλιέργεια σὲ στερεὸ θρεπτικὸ ὕλικὸ (MacConkey agar).

Γιὰ κάθε δείγμα ποὺ ἐξετάστηκε ἔγινε προεμπλουτισμὸς σὲ 225 ml buffered peptone water (BPW) (Edel καὶ Kampelmacher, 1973). Τὸ ὕλικὸ RV παρασκευάστηκε στὸ ἐργαστήριό ἀπὸ τὰ τρία ἀπαραίτητα διαλύματα Α, Β, C σύμφωνα μὲ τὴ μέθοδο τῶν Vassiliadis καὶ συν. (1976, 1977, 1981, 1983). Γιὰ τὴν παρασκευὴ τοῦ ὕλικου TT χρησιμοποιήθηκε τὸ βασικὸ ὕλικὸ τοῦ ἐμπορίου (Difco) μὲ τὴν προσθήκη διαλύματος brilliant green σὲ τελικὴ πυκνότητα 1:100.000. Ὡς στερεὸ ἐκλεκτικὸ ὕλικὸ χρησιμοποιήθηκε τὸ brilliant green deoxycholate agar (BGDA) (Vassiliadis καὶ συν., 1979).

Μετὰ ἀπὸ τὸν προεμπλουτισμὸ καὶ ἐπώαση 24 ὥρῶν σὲ 37° C, 0,1 ml τοῦ προεμπλουτισμένου δείγματος μεταφερόταν σὲ σωλήνα μὲ 10 ml ὕλικου RV, ἐνῶ 1 ml ἀπὸ τὸ ἴδιο δείγμα μεταφερόταν σὲ σωλήνα μὲ 10 ml ὕλικου TT. Οἱ σωλῆνες ἐπώαζοντο σὲ 43° C γιὰ 24 καὶ 48 ὥρες. Ἀκολουθοῦσε σπορὰ στὸ στερεὸ θρεπτικὸ ὕλικὸ BGDA καὶ ἐπώαση γιὰ 24 ὥρες σὲ 37° C. Ἀπὸ κάθε τρυβλίο δύο ὑποπτές ἀποικίες ἐνοφθαλμίζονταν σὲ κεκλιμένους σωλῆνες μὲ Kligler iron agar. Οἱ ὑποπτές καλλιέργειες ἐξετάζονταν περαιτέρω μὲ βιοχημικὲς καὶ ὁρολογικὲς μεθόδους.

Ἡ στατιστικὴ ἀνάλυση τῶν στοιχείων ἔγινε μὲ τὴ δοκιμασία κατὰ ζεύγη χ^2 (MacNemar's test).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ἡ συμπεριφορὰ τῶν ἐμπλουτιστικῶν ὕλικῶν RV καὶ TT, ὅσον ἀφορᾷ τὴν ἀπομόνωση σαλμονελλῶν, φαίνεται στοὺς πίνακες 1 καὶ 2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Αποτελεσματικότητα εμπλουτιστικών υλικών στην απομόνωση σαλμονελλών από 100 δείγματα γάλακτος μολυνθέντα με *S. typhimurium*

Εμπλουτιστικά υλικά*	Θετικά δείγματα	Θετικά %	Περίοδος επώασης	
			Θετικά 24h	Θετικά 48h
RV/43° C	97	97.0	97 (100%)	96 (99%)
TT/43° C	86	86.0	79 (92%)	83 (96%)

* RV = Rappaport - Vassiliadis medium, επώαση σε 43° C

TT = Tetrathionate brilliant green broth, επώαση σε 43° C

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Αποτελεσματικότητα εμπλουτιστικών υλικών στην απομόνωση σαλμονελλών από 100 δείγματα γάλακτος μολυνθέντα με *S. typhimurium* και Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς*

Εμπλουτιστικά υλικά**	Θετικά δείγματα	Θετικά %	Περίοδος επώασης	
			Θετικά 24h	Θετικά 48h
RV/43° C	79	79.0	73 (92%)	73 (92%)
TT/43° C	41	41.0	31 (76%)	38 (92%)

* Enterobacteriaceae και Pseudomonas

** Δες ύποσημείωση Πίνακα 1.

Στόν πίνακα 1 φαίνονται τὰ θετικά δείγματα στο σύνολο αὐτῶν πού μολύνθηκαν μόνο με στέλεχος *S. typhimurium*. Ἀπό τὰ 100 ἐξετασθέντα δείγματα 97 βρέθηκαν θετικά με τὸ υλικὸ RV ἐνῶ 86 ἦταν θετικά με τὸ υλικὸ TT. Ἡ διαφορὰ ἦταν στατιστικὰ λείαν σημαντικὴ ($\chi^2 = 11$, $P < 0.001$). Σαλμονέλλες ἀπομονώθηκαν μετὰ ἀπό

24 ώρες επώαση απ' όλα τα θετικά με το υλικό RV δείγματα (100%) ενώ σε 79 (92%) από τα 86 θετικά με το υλικό TT δείγματα.

Στόν πίνακα 2 φαίνονται τα θετικά δείγματα στο σύνολο αυτών που μολύνθηκαν με *S. typhimurium* και δύο ανταγωνιστικούς Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς. Από τα 100 εξετασθέντα δείγματα 79 βρέθηκαν θετικά με το υλικό RV, ενώ μόνο 41 ήταν θετικά με το υλικό TT. Η διαφορά ήταν στατιστικά λίαν σημαντική ($\chi^2 = 36.1$, $P < 10^{-6}$). Μετά από 24 ώρες επώαση απομονώθηκαν σαλμονέλλες σε 73 από τα 79 θετικά με το υλικό RV δείγματα (92%) ενώ μόνο σε 31 από τα 41 θετικά με το υλικό TT δείγματα (76%).

Η ανάπτυξη των ανταγωνιστικών μικροοργανισμών ήταν διαφορετική στα δύο εμπλουτιστικά υλικά και σαφώς πολύ περισσότερη στο υλικό TT. Έτσι, η μέση τιμή ανάπτυξής τους στο υλικό RV μετά από 24 και 48 ώρες επώαση στους 43° C ήταν 0.81 και 0.92 αντίστοιχα, ενώ οι σχετικές τιμές για το υλικό TT ήταν 1.81 και 1.87.

ΣΧΟΛΙΟ

Τα εύρηματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι το υλικό RV είναι περισσότερο αποτελεσματικό από το υλικό TT για την απομόνωση σαλμονελλών από υγρό πλήρες γάλα, τόσο επί απουσία όσο και επί παρουσία ανταγωνιστικών Gram αρνητικών μικροοργανισμών. Η υπεροχή αυτή δεν περιορίζεται μόνο στον αριθμό των θετικών δειγμάτων αλλά και στην ταχύτητα ανιχνεύσεως αυτών (επώαση 24 ωρών) όπως φαίνεται από τους πίνακες 1 και 2. Το υλικό RV είναι επίσης πιο έκλεκτικό από το υλικό TT, διότι εμποδίζει την ανάπτυξη των ανταγωνιστικών οργανισμών πολύ περισσότερο (περίπου διπλάσια αναστολή ανάπτυξεως).

Τα εύρηματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα εύρηματα του Northolt και συν. (1985) που αναφέρουν επίσης μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και έκλεκτικότητα του υλικού RV έναντι του υλικού TT. Είναι επίσης συμβατά με τα εύρηματα των Wilson και συν. (1988) οι όποιοι διαπίστωσαν διπλάσια ανάπτυξη της *S. typhimurium* στο υλικό RV απ' ό,τι στο υλικό TT (MPN/ml RV = 9.3×10^5 , TT = 4.3×10^5).

SUMMARY

Isolation of *Salmonella* from fluid milk with the use of Rappaport-Vassiliadis medium.

The performances of Rappaport - Vassiliadis (RV) medium and tetrathionate brilliant green broth (TT) for the detection of salmonellae in pasteurized fluid whole milk, artificially contaminated, were compared. The RV medium was found to be more sensitive and more selective than the TT medium, as far as *S. typhimurium* was concerned. From the 100 samples contaminated with *S. typhimurium*, 97 were found positive with RV medium, while only 86 were found positive with TT medium ($P < 0.001$). From the 100 samples contaminated with *S. typhimurium* plus Gram negative competing organisms, 79 were found positive with RV medium, while only 41 with TT medium ($P < 10^{-6}$). The mean values of growth of competing organisms in RV medium after 24h and 48h of incubation at 43° C were 0.81 and 0.92 respectively, while the corresponding values in TT medium were 1.81 and 1.87.

REFERENCES

1. Beckers, H. J., F. M. van Leusden, M. J. M. Meyssen and E. H. Kampelmacher, Reference material for food evaluation of a standard method for the detection of *Salmonella* in foods and feeding stuffs. J. Appl. Bacteriol. 1985, **59**, 507-512.
2. Beckers, H. J., D. Roberts, O. Pietzsch, M. van Schothorst, P. Vassiliadis and E. H. Kampelmacher, Replacement of Muller-Kauffmann's tetrathionate brilliant green bile broth by Rappaport - Vassiliadis' magnesium chloride malachite green broth in the standard method for the detection of salmonellae. Int. J. Food Microbiol. 1987, **4**, 59-64.
3. Edel, W. and E. H. Kampelmacher, Comparative studies on the isolation of sublethally injured salmonellae in nine European laboratories. Bull. World Health Org. 1973, **48**, 167-174.
4. Northolt, M. D., J. Stadhouders and W. van Asseldonk, Compa-

- ri son of Rappaport - Vassiliadis medium and Muller - Kauffmann medium for the detection of salmonellae in caseinate and milk powder. *Neth. Milk Dairy* 1985, **39**, 49-55.
5. Vassiliadis, P., The Rappaport - Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: an overview. *J. Appl. Bacteriol.* 1983, **54**, 69-76.
 6. Vassiliadis, P., A. Kalandidi, E. Xirouchaki, J. Papadakis and D. Trichopoulos, Isolement des salmonelles à partir des saucisses des porcs en utilisant un nouveau procédé d'enrichissement (R10/430). *Rec. Méd. Vét.* 1977, **153**, 489-494.
 7. Vassiliadis, P., V. Kalapothaki, D. Trichopoulos, Ch. Mavromatti and Ch. Sérié, Improved isolation of salmonellae from naturally contaminated meat products by using Rappaport - Vassiliadis enrichment broth. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, **42**, 615-618.
 8. Vassiliadis, P., E. Pateraki, N. Papaiconomou, J. A. Papadakis and D. Trichopoulos, Nouveau procédé d'enrichissement de *Salmonella*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 1976, **127**, B, 195-200.
 9. Vassiliadis, P., D. Trichopoulos, J. Papadakis, V. Kalapothaki and Ch. Sérié, Brilliant green deoxycholate agar as an improved selective medium for the isolation of *Salmonella*. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* 1979, **59**, 117-120.
 10. Vassiliadis, P., D. Trichopoulos, J. Papadakis, V. Kalapothaki, X. Zavitsanos and Ch. Sérié, *Salmonella* isolation with Rappaport's enrichment medium of different compositions. *Zbl. Bact. Hyg. I. Abt. Orig. B* 1981, **173**, 382-389.
 11. Wilson, C. R., W. H. Andrews, P. L. Poelma and V. R. Bruce, Recovery of *Salmonella* from fluid milk. *J. Food Prot.* 1988, **51**, 409-411.