

ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΤΗΣ 28ΗΣ ΜΑΪΟΥ 1992

ΠΡΟΕΔΡΙΑ ΜΙΧΑΗΛ ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΟΥ

ΥΓΙΕΙΝΗ... **Αποτελεσματικότητα απομονώσεως σαλμονελλών από φυσικώς μολυσμένα δείγματα, με το εμπλουτιστικό ύλικό Rappaport-Vassiliadis μετά επώαση στις θερμοκρασίες 41^ο, 42^ο και 43^ο C, υπό Π. Βασιλειάδη, Ι. Α. Παπαδάκη, Α. Μεντή, Δ. Τριχοπούλου***, δια του 'Ακαδημαϊκού κ. Πέτρου Βασιλειάδη.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την αξιολόγηση τής αποτελεσματικότητας του εμπλουτιστικού ύλικου Rappaport-Vassiliadis δια την απομόνωση σαλμονελλών από περιβαλλοντικά δείγματα, όπως τρόφιμα, νερό κ.ά., χρησιμοποιήθηκε από έμας (Vassiliadis και συν. 1976, Vassiliadis 1983) αλλά και από ξένους έρευνητές (Van Schothorst and Renaud 1983, Beckers και συν. 1987, Tongpim και συν. 1984, Fricker 1984) θερμοκρασία επώασεως 43°C.

Νεώτερες δημοσιεύσεις (Patil and Panhad 1986, Rhodes and Quesnel 1986, Truscott and Lammerding 1987, Van Schothorst και συν. 1987) καθώς και ό International Organization for Standardization - ISO (Anon. 1990) συνιστούν θερμοκρασία επώασεως τούς 42°C. Σε σχετική έρευνα τών Peterz και συν. (1989) έγινε σύγκριση τών δυνατοτήτων πολλαπλασιασμού τών σαλμονελλών στο ύλικό RV κατά την επώαση σε θερμοκρασίες 40°, 42° και 43°C αλλά χρησιμοποιήθηκαν καθαρά καλλιεργήματα και όχι μεικτή χλωρίδα όπως στα φυσικά δείγματα. Από την προσιτή σε μάς βιβλιογραφία προκύπτει ότι δέν έχει γίνει συγκριτική μελέτη

* P. VASSILIADIS, J. A. PAPADAKIS, A. MENTIS, D. TRICHOPOULOS, **Isolation of *Salmonella* from naturally contaminated samples with the Rappaport-Vassiliadis medium after incubation at 41°, 42° and 43° C.**

άπομονώσεως σαλμονελλών με επώαση του RV στις 3 θερμοκρασίες όταν έμβολιασθεῖ με φυσικά δείγματα.

Στην παρούσα εργασία δίδονται και συζητούνται τα αποτελέσματα της σχετικής έρευνας, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα νερού, φυσικῶς μολυσμένα και τὸ εμπλουτιστικὸν ὑλικὸν RV επώασθη στις θερμοκρασίες 41°, 42° και 43°C.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δείγματα

Κατὰ τὴ χρονικὴ περίοδο Μαρτίου - Δεκεμβρίου 1991 ἐλήφθησαν 251 δείγματα νεροῦ ἀπὸ τὸν ποταμὸ Κηφισσὸ, ὁ ὁποῖος διασχίζει ἀπὸ βορρὰ πρὸς νότον κατοικημένες και βιομηχανοποιημένες περιοχὲς τῶν Ἀθηνῶν και Πειραιᾶ.

Θρεπτικὰ ὑλικά

Διὰ τὸν προεμπλουτισμὸν χρησιμοποιήθηκε πεπτονοῦχον ὕδωρ με κανονιστικὸν διάλυμα (Buffered peptone water - BPW) σύμφωνα με Edel and Kampelmacher (1973). Τὸ εμπλουτιστικὸ ὑλικὸ Rappaport-Vassiliadis παρεσκευάσθη σύμφωνα με Vassiliadis (1983) και ISO (Anon 1990). Ὡς ἐκλεκτικὸ στερεὸ θρεπτικὸ ἄγαρ χρησιμοποιήθηκε τὸ ἄγαρ με στίλβον πράσινον (Brilliant Green agar - OXOID CM 329) με προσθήκη 2,5 γραμ. δεσοξυχολικῶν νατρίου ἀνὰ λίτρο (BGDA), τροποποίηση Vassiliadis και συν. (1979α). Τὸ ὑλικὸ αὐτὸ ἔχει βρεθεῖ ἐξ ἴσου ἀποτελεσματικὸ ὅπως και τὰ θρεπτικὰ ἐκλεκτικὰ ἄγαρ με θειῶδες βισμούθιον (BiSA) (DIFCO) και τὸ με στίλβον πράσινον - σουλφαπυριδίνη ἄγαρ (DIFCO) (Kalapothaki και συν. 1980), περιλαμβάνεται δὲ μεταξὺ τῶν τριῶν πρώτων σὲ ἀποτελεσματικότητα ὑλικῶν, ἀπὸ ἐπτά, τὰ ὁποῖα μελετήθηκαν ἀπὸ τοὺς Fricker and Girdwood (1984).

Μέθοδοι

Δεκαπέντε κ.έκ. ἀπὸ κάθε δεῖγμα νεροῦ ἀπὸ τὸν Κηφισσὸ ἐνεβολιάζοντο σὲ 15 κ.έκ. διπλῆς πυκνότητος BPW και τὰ δοχεῖα επώάζοντο σὲ 37°C ἐπὶ 18-22 ὥρες. Μετὰ τὴν επώαση 0,1 κ.έκ. ἀπὸ κάθε δοχεῖο BPW προσετίθετο σὲ 3 σωλῆνες με 10 κ.έκ. ὑλικὸ RV, οἱ ὁποῖοι επώάζοντο στις ἐξῆς 3 θερμοκρασίες: 41°, 42° και 43°C. Χρησιμοποιήθηκαν εἰδικῆς κατασκευῆς ὕδατόλουτρα (Bioblock scientific polystat 86602) και ὁ ἔλεγχος τῆς διακυμάνσεως τῆς θερμοκρασίας ἔγινε με βαθμολογημένα θερμομέτρα ψηφιακῆς τεχνολογίας. Διεπιστώθη ὅτι κατὰ τὴ διάρκεια τῆς επώασσεως ἡ διακύμανση δὲν ἦταν μεγαλύτερη ἀπὸ $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Ἀπὸ

τὸ ὑλικὸ RV μετὰ ἀπὸ 24 ὥρες ἐπώαση ἐνεβολιάζοντο τρυβλία μὲ BGDA, τὰ ὁποῖα μετὰ 24 ὥρες στοὺς 37°C ἠλέγχοντο ἐὰν εἶχαν ἀποικίες ὑποπτές σαλμονελλῶν. Δύο ἀπὸ τὶς ὑποπτές ἀποικίες ἐνεβολιάζοντο σὲ διαφοροποιητικὸ ὑλικὸ Kligler, μετὰ τὴν ἐπώαση τοῦ ὁποῖου ἐγένετο ἡ τελικὴ ταυτοποίηση μὲ βιοχημικὲς καὶ ὁρολογικὲς δοκιμασίες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συνολικὰ ἐξετάστηκαν 251 δείγματα νεροῦ ἀπὸ τὸν Κηφισσοῦ ποταμὸ. Τὰ ἀποτελέσματα συνοψίζονται στὸν πίνακα 1. Θετικὰ γιὰ σαλμονέλλες σὲ μία ἢ περισσό-τερες θερμοκρασίες ἐπώασεως, βρέθηκαν 140 δείγματα, (55,8%) ἀλλὰ ἀνὰ θερμοκρασία ἐπώασεως 41°, 42° καὶ 43°C, τὰ θετικὰ δείγματα ἦταν ἀντιστοίχως 98, 93 καὶ 117.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Κατανομὴ τῶν 251 δειγμάτων νεροῦ ἀναλόγως τῆς θερμοκρασίας ἐπώασεως 41°, 42° καὶ 43°C καὶ τοῦ θετικοῦ ἢ ἀρνητικοῦ διὰ σαλμονέλλας ἀποτελέσματος

Θερμοκρασία ἐπώασεως			Ἀριθμὸς δειγμάτων*
41°C	42°C	43°C	
+	+	+	65
+	+	—	9
+	—	+	18
+	—	—	6
—	+	+	11
—	+	—	8
—	—	+	23
—	—	—	111
98	93	117	251

+ = Θετικὰ διὰ σαλμονέλλες, — = Ἀρνητικὰ διὰ σαλμονέλλες.

* Σύνολο θετικῶν δειγμάτων σὲ μία ἢ περισσότερες θερμοκρασίες: 140.

Ἡ στατιστικὴ ἀξιολόγηση τῶν διαφορῶν ἔγινε μὲ τὴ δοκιμασία κατὰ ζεύγη χ^2 (McNemars test), δεδομένου ὅτι οἱ πρὸς σύγκριση σωλῆνες τῶν διαφόρων θερμοκρασιῶν εἶχαν ἐμβολιασθεῖ μὲ τὸ ἴδιο ὑλικό. Εἶναι προφανές (πίνακας 1) ὅτι ἡ ἐπώαση στοὺς 43°C ἀποδίδει σαφῶς καλύτερα ἀποτελέσματα ἀπὸ ὅ,τι στοὺς 41°C (κατὰ ζεύγη χ^2 , διόρθωση κατὰ YATES: 6,61, $P \sim 0,01$) ἢ στοὺς 42°C ($\chi^2=9,12$,

$P \sim 0,003$) ενώ δέν παρατηρεῖται ἀξιοσημείωτη διαφορὰ μεταξύ τῶν θερμοκρασιῶν 41°C καὶ 42°C ($\chi^2=0,37$, $P>0,5$). Ἐπειδὴ ἡ κατὰ 1 βαθμὸ μόνον αὐξήση τῆς θερμοκρασίας δὲν δικαιολογεῖ ἴσως τόσο διαφορετικὸ ἀποτέλεσμα, θεωρήθηκε ἐνδιαφέρον νὰ ἐρευνηθεῖ κάποιος ἄλλος παράγων γιὰ τὴν ἐρμηγεία τῶν εὐρημάτων. Μεταξὺ ἄλλων παρατηρήθη ὅτι ὁ πολλαπλασιασμός τῆς πυοκυανικῆς Ψευδομονάδος (*Ps. aeruginosa*) παρεμποδίζεται μερικῶς στοὺς 43°C εἰς τὸ ὑλικὸ RV καὶ τὸ φυσικὸ ἐρώτημα ἦταν μήπως ἡ παρουσία τοῦ εἰδικοῦ αὐτοῦ μικροοργανισμοῦ στὰ δείγματα μᾶς ἦταν ἡ αἰτία τῶν παρατηρούμενων διαφορῶν. Σημειώνεται πάντως ὅτι οἱ ἀποικίες τῆς *Ps. aeruginosa* στὸ ἐκλεκτικὸ ὑλικὸ BGDA εἶναι παρόμοιες πρὸς τὶς ἀποικίες τῶν σαλμονελλῶν καὶ ἡ ἀφθονη, ἰδίως, ἀνάπτυξή τους, μπορεῖ νὰ καλύψει ἢ νὰ ἐμποδίσαι τὴν ἀνίχνευση τῶν ἀποικιῶν τῶν σαλμονελλῶν. Στὸν πίνακα 2 ἀνα-

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Ἀπομόνωση σαλμονελλῶν μετὰ ἐπάωση στοὺς 42°C ἢ 43°C ἀναλόγως τῆς παρουσίας ἢ ὄχι *Ps. aeruginosa* εἰς 42°C

Δείγματα ΘΕΤΙΚΑ διὰ <i>Ps. aeruginosa</i>			Δείγματα ΑΡΝΗΤΙΚΑ διὰ <i>Ps. aeruginosa</i>		
42°C	43°C	Ἀριθμὸς δειγμάτων	42°C	43°C	Ἀριθμὸς δειγμάτων
+	+	41	+	+	35
—	+	36	—	+	5
+	—	6	+	—	11
—	—	59	—	—	58
47	77	142	46	40	109
(ΣΥΝΟΛΟΝ)					

+ = Θετικὰ διὰ σαλμονέλλες.

— = Ἀρνητικὰ διὰ σαλμονέλλες.

γράφονται τὰ ἀποτελέσματα ἀπομονώσεως σαλμονελλῶν στὶς θερμοκρασίες 42° καὶ 43°C ἀναλόγως τῆς παρουσίας ἀποικιῶν Ψευδομονάδων ἢ ὄχι εἰς 42°C . Στὸν πίνακα αὐτὸ φαίνεται ὅτι στὰ 142 δείγματα, στὰ ὅποια ἀνεπτύχθη ἡ Ψευδομονάδα στοὺς 42°C ἀπομονώθηκαν σαλμονέλλες σὲ 77 δείγματα μετὰ ἀπὸ ἐπάωση στοὺς 43°C , ἐνῶ μόνον 47 σὲ ἐπάωσθέντα στοὺς 42°C , μία διαφορὰ ἡ ὅποια εἶναι στατιστικῶς λίαν σημαντικὴ (κατὰ ζεύγη χ^2 μὲ διόρθωση κατὰ YATES=20,02, $P<0,001$). Ἀντιθέτως στὰ 109 δείγματα χωρὶς ἀνάπτυξη ψευδομονάδων τὰ 46 δείγματα ἦταν

θετικά στους 42°C και 40 στους 43°C, διαφορά μη στατιστικῶς σημαντική ($x^2=1,56$ $P>0,1$). Ἀπὸ τὰ ἀνωτέρω προκύπτουν σαφεῖς ἐνδείξεις ὅτι ἡ ἐπώαση στοὺς 43°C δίδει καλλίτερα ἀποτελέσματα μόνον ὅταν πολλὰ ἀπὸ τὰ δείγματα περιέχουν στὴ γλωρίδα τους τὸ μικροοργανισμό *Ps. aeruginosa*. Ἀναφερόμενοι στὴν προηγούμενη ἐμπειρία μας προερχόμενη ἀπὸ περισσότερες τῶν 20 ἐρευνῶν (Vassiliadis 1983), κατὰ τίς ὁποῖες ἐξετάστηκε μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικῶν δειγμάτων (κρέατα, κρεατοσκευάσματα, ζωοτροφές, κόπρανα, ἐπιφανειακά, ὑπόγεια καὶ θαλάσσια νερὰ καὶ λύματα) προκύπτει ὅτι ἡ παρουσία *Ps. aeruginosa* στὰ τελικὰ καλλιεργήματα ἦταν σπάνια, μὲ συχνότητα κυμαινόμενη ἀπὸ 0-3%. Ἐξάιρεση ἀποτέλεσε μία μελέτη σὲ 255 δείγματα κοπράνων χοίρων. Στὴν ἐξάιρεση αὐτή (Vassiliadis καὶ συν. 1979β) ἡ *Ps. aeruginosa* βρέθηκε στὸ 8,6% τῶν καλλιεργείων μὲ RV στοὺς 43°C, σὲ 14,5% μὲ τὸ ὕλικό R25, τροποποίηση τοῦ ἀρχικοῦ ὕλικου Rappaport, ἐπωασθὲν στοὺς 37°C (Vassiliadis καὶ συν. 1976) καὶ σὲ 26,7% τῶν δειγμάτων, τὰ ὁποῖα ἐξετάστηκαν μὲ Muller-Kauffmann τετραθειονικό ζωμὸ στοὺς 43°C. Ἀντιθέτως στὰ 251 δείγματα νεροῦ τοῦ Κηφισοῦ, τὰ ὁποῖα ἐξετάσαμε, ἡ *Ps. aeruginosa* ἀναπτύχθηκε σὲ 162 δείγματα (ποσοστὸ 64,5%), δηλαδή σὲ πολὺ ὑψηλὴ συχνότητα, ἡ ὁποία ἐρμηνεύει καὶ τὴν σαφὴ ὑπεροχὴ ($P\sim 0,003$) ἀποτελέσματος στὴ θερμοκρασία τῶν 43°C.

Ἀπὸ τὰ ἀποτελέσματα τῆς παρουσίας μελέτης μπορεῖ νὰ διατυπωθεῖ ὡς τελικὸ συμπέρασμα ὅτι ἡ ἐπώαση τοῦ ἐμπλουτιστικοῦ ὕλικου σὲ 41°, 42° ἢ 43°C δὲν προκαλεῖ διαφορά στὸ ἀποτέλεσμα γιὰ τὴν ἀπομόνωση σαλμονελλῶν καὶ ἐπομένως οἱ πλέον πρόσφατες συστάσεις ἐρευνητῶν καὶ τοῦ ISO γιὰ ἐπώαση στοὺς 42°C ἰσχύουν γιὰ τὸ μεγαλύτερο ποσοστὸ τῶν δειγμάτων. Γιὰ νὰ ἀντιμετωπισθεῖ ἡ ἐνδεχόμενη παρεμβολὴ σὲ πολὺ σπάνια δείγματα, ἰσχυρῆς ἀνάπτυξης τῆς *Ps. aeruginosa* στὸ ὕλικό RV σὲ 42°C, πρέπει νὰ ἐξετάζονται τουλάχιστον τέσσερες ἀποικίες ἀπὸ τὸ ὕλικό BGDA καὶ νὰ ἐμβολιάζεται τὸ ὕλικό RV καὶ σὲ ἐκλεκτικὸ ἄγαρ μὲ θειῶδες βισμούθιο (BiSA).

Γιὰ τὴν ἐπώαση στοὺς 42°C συνηγορεῖ ἡ ἔρευνα τῶν Peterz καὶ συν. (1989), σύμφωνα μὲ τὴν ὁποία ἡ *S. dublin*, ὀρότυπος τῶν βοοειδῶν, ἀναπτύσσεται καλὰ στοὺς 42°C ἀλλὰ σχεδὸν ἀναστέλλεται τελείως στοὺς 43°C. Τέλος σημειώνεται ὅτι, ἐὰν ἡ ἐπώαση γίνεῖ στοὺς 42°C σὲ κλίβανο ἀέρος, ὑπάρχει περιθώριο παραδεκτῆς διακύμανσης τῆς θερμοκρασίας ὅταν ὁ κλίβανος δὲν εἶναι ἐφοδιασμένος μὲ πολὺ εὐαίσθητο σύστημα ρυθμίσεως.

Ἡ παρούσα ἐργασία χρηματοδοτήθηκε ἀπὸ τὴν Ἐπιτροπὴ Ἐρευνῶν τῆς Ἀκαδημίας Ἀθηνῶν.

SUMMARY

Isolation of *Salmonella* from naturally contaminated samples with the Rappaport-Vassiliadis medium after incubation at 41°, 42° and 43°C.

The efficiency of *Salmonella* isolation from 251 naturally contaminated river water samples with Rappaport-Vassiliadis (RV) medium was examined after incubation at 41°, 42° and 43°C. In the usual situation, when samples are negative for *Pseudomonas aeruginosa*, there is no substantial or statistically significant difference among the three incubation temperatures, and incubation at 42° allows for temperature fluctuation within an acceptable range of 41° to 43°C. In the presence of *Ps. aeruginosa* in a great number of samples, incubation at 43°C is advantageous for *Salmonella* isolation because *Ps. aeruginosa* is relatively inhibited at 43°C in RV medium.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anonymous, 1990, Microbiology — General guidance on methods for the detection of *Salmonella*. International Standard ISO 6579. Revision of second edition, 1211 Geneva 20. Switzerland. International Organization for Standardization.
- Beckers, H. J., Roberts, D., Pietzsch, O., Van Schothorst, M., Vassiliadis, P., Kampelmacher, E. H., 1987, Replacement of Muller Kauffmann's tetrachionate brilliant green bile broth by Rappaport-Vassiliadis' magnesium chloride malachite green broth in the standard method for the detection of salmonellae. International Journal of Food Microbiology 4, 59-64.
- Edel, W. & Kampelmacher, E. H., 1973, Comparative studies on the isolation of sublethally injured salmonellae in nine European laboratories. Bulletin of the World Health Organization 48, 167-174.
- Fricke, C. R., 1984, A comparison of methods for the isolation of salmonellae from sewage sludge. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. I. Abt. Originale B. Hygiene, Präventive Medizin 179, 170-178.
- Fricke, C. R. & Girdwood, R. W. A., 1984, The effect of the use of different selective media on the ability to recover salmonellae from seagull faeces. Journal of Hygiene 93, 35-42.
- Kalapothiski, V., Xirouchaki, E., Mavrommati, Ch., Trichopoulos, D., Vassiliadis, P. & Sérié, Ch., 1980, Efficacité du milieu d'enrichissement de Rappaport - Vassiliadis et du milieu sélectif gélose au vert brillant-désoxycholate

- dans l'isolement des salmonelles. Archives de l'Institut Pasteur Hellénique 26, 41-44.
- Patil, M. D. & Panhad, N. M., 1986, Growth of salmonellas in different enrichment media. Journal of Applied Bacteriology 61, 19-24.
- Peterz, M., Wiburg, C. & Norberg, P., 1989, The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of *Salmonella* in home-made and in commercially available dehydrated Rappaport - Vassiliadis broths. Journal of Applied Bacteriology 66, 523-528.
- Rhodes, P. & Quesnel, L. B., 1986, Comparison of Muller Kauffmann tetrachionate broth with Rappaport - Vassiliadis (RV) medium for the isolation of salmonellas from sewage sludge. Journal of Applied Bacteriology 60, 161-167.
- Tongpim, S., Beumer, R. R., Taminga, S. K. & Kampelmacher, E. H., 1989, Comparison of modified Rappaport's medium (RV) and Muller Kauffmann medium (MK - ISO) for the detection of *Salmonella* in meat products. International Journal of Food Microbiology 1, 33-42.
- Truscott, R. B. & Lammerding, A. M., 1987, Millipore filtration and use of RV medium for isolation of *Salmonella* from preenrichment broths. Journal of Food Protection 50, 815-819.
- Van Schothorst, M. & Renaud, A. M., 1983, Dynamics of *Salmonella* isolation with modified Rappaport's medium (RIO). Journal of Applied Bacteriology 54, 200-215.
- Vassiliadis, P., 1983, The Rappaport - Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: An overview, Journal of Applied Bacteriology 54, 69-76.
- Vassiliadis, P., Pateraki, E., Papaiconomou, N., Papadakis, J. A. & Trichopoulos, D., 1976, Nouveau procédé d'enrichissement de *Salmonella*. Annales de Microbiologie (Institut Pasteur) 127B, 195-200.
- Vassiliadis, P., Trichopoulos, D., Papadakis, J., Kalapothaki, V., & Sérié, Ch., 1979a, Brilliant green deoxycholate agar as an improved selective medium for the isolation of *Salmonella*. Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale 59, 117-120.
- Vassiliadis, P., Trichopoulos, D., Kalapothaki, V., Papadakis, J. & Sérié, Ch., 1979b, Isolement de salmonelles à partir de matières fécales de porc apparemment sains, avec le nouveau procédé d'enrichissement R10/43°C. Recueil de Médecine Vétérinaire 155, 559-566.