

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην πτυχιακή μου εργασία συγκεκριμένα αναφέρομαι στο πρώτο κεφαλαίο για τα είδη των Κλωστηριδίων, ποια και πόσα είδη υπάρχουν. Την μορφολογία και σε ποια οικογένεια ανήκουν. Την κατανομή τους στην φύση, την ανθεκτικότητα τους. Την αντιγονική τους σύσταση, την ταξινόμηση τους. Τα καλλιεργητικά χαρακτηριστικά τους και την επιδημιολογία τους συμπεριφορά.

Στο δεύτερο κεφάλαιο αναφέρομαι αναλυτικά για τις βιοχημικές δοκιμές απομόνωσης των Κλωστηριδίων. Εργαστηριακές, ορολογικές και επιδημιολογικές εξετάσεις. Τα υποστρώματα και τα τελικά αποτελέσματα της χρώσης των Κλωστηριδίων, με απεικονίσεις αυτών.

Στο τρίτο και τελευταίο κεφάλαιο της εργασίας αναφέρομαι για τα Κλωστηρίδια στα ζώα και τις επιπτώσεις. Ποια ζώα προσβάλλει, τον τρόπο μετάδοσης και ποια είναι αναλυτικά αυτά τα είδη.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια μου την κ.Παλλα για τις επισημάνσεις της και τις συμβουλές που μου πρόσφερε καθ όλη την διάρκεια της εργασίας μου.

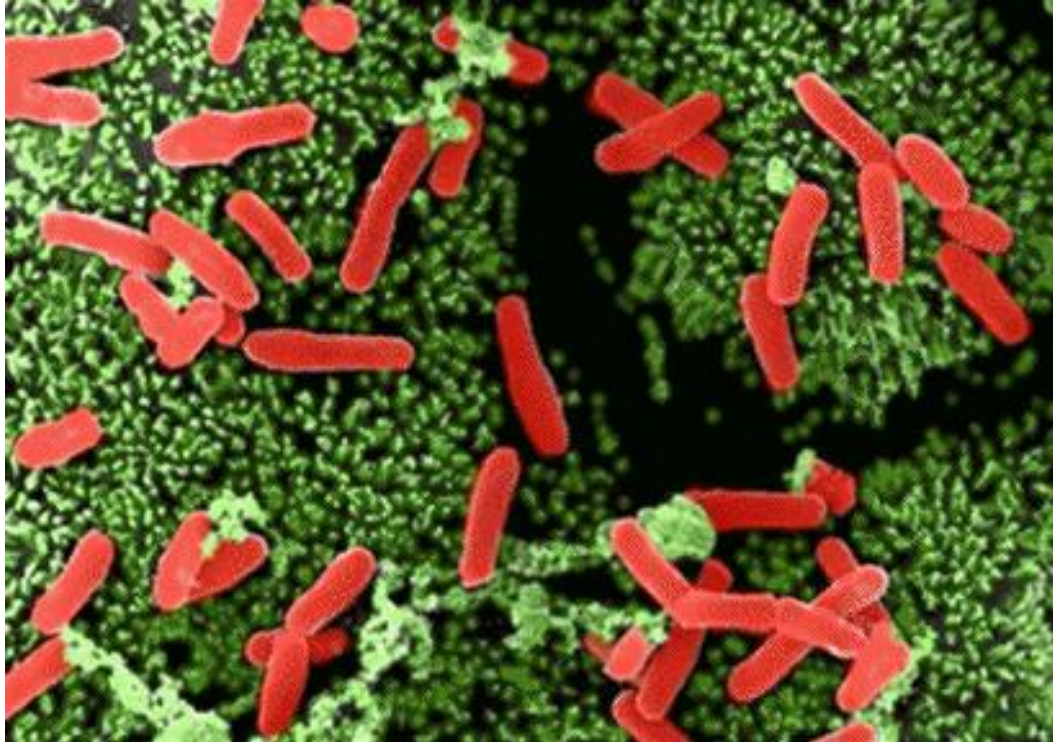
Αφιερωμένο στην πολυαγαπημένη μου γιαγιά ,  
που με φώτισε και μου έδωσε δύναμη να ολοκληρώσω τους στόχους μου.

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ:ΣΤΕΓ

ΤΜΗΜΑ:ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΓΡΗΓΟΡΙΑΔΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑΣ:

## ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΩΝ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:ΕΛΙΣΑΒΕΤ ΠΑΛΛΑ

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ ΓΡΗΓΟΡΙΑΔΟΥ

Σίνδος 13/6/2009

# **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>. Γενικά περί Κλωστηριδίων.**

- 1.1 Γένος Κλωστηρίδια
- 1.2 Μορφολογία
- 1.3 Βιοχημικές ιδιότητες
- 1.4 Καλλιεργητικοί χαρακτήρες
- 1.5 Επιδημιολογία

## **Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>. Βιοχημικές δοκιμές.**

### **2.1 Εργαστηριακή διάγνωση του Clostridium**

- 2.1.2 Μέθοδος ενσωματώσεως
- 2.1.3 Μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης
- 2.1.4 Μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων

### **2.2 Ταυτοποίηση**

- 2.2.1 Προκαταρτική ταυτοποίηση
- 2.2.2 Αντιβιογράμμα
- 2.2.3 Βιοχημικές δοκιμασίες

### **2.2.4 Κύρια ταυτοποίηση**

- 2.2.4.1 Έλεγχος των τελικών μεταβολικών προϊόντων
- 2.2.4.2 Βιοχημική ταυτοποίηση

### **2.2.5 Νέες μέθοδοι ταυτοποίησης**

### **2.2.6 Συστήματα επώασης αναερόβιων καλλιεργειών**

### **2.3 Υλικά και μέθοδοι απομόνωσης για τα είδη Clostridium**

- 2.3.1 Απαιτούμενα υλικά

2.3.2 Μέθοδοι απομόνωσης και ταυτοποίησης για τα είδη Clostridium

## **2.4 Θρεπτικά υποστρώματα για την καλλιέργεια των Κλωστηριδίων.**

2.4.1 Medium Lactose- Sulfite

2.4.2 Brain heart infusion Broth

2.4.3 Blood Agar

2.4.4 Triple Sugar Iron Agar (TSI)

2.4.5 Πεπτονούχο νερό

2.4.6 Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar

2.4.7 Rappaport

## **2.5 Βιοχημικές δοκιμές**

2.5.1 Δοκιμή κινητικότητας

2.5.2 Δοκιμή ινδολης

2.5.3 Δοκιμή κιτρικών αλάτων

2.5.4 Δοκιμή του ερυθρού μεθυλίου(methyl red test)

2.5.5 Δοκιμή Vogues-Proskauer/VP

2.5.6 Δοκιμή ανάπτυξης παρουσία κυανιούχου καλίου

2.5.7 Δοκιμή παραγωγής ουρεασης(urease test)

2.5.8 Δοκιμή παραγωγής υδρόθειου

2.5.9 Δοκιμή β- γαλακτοσιδάσης(ONPG TEST)

2.5.10 Δοκιμή αντίδραση Nagler

2.5.11 Δόκιμη οξειδάσης

## **2.6 Εξετάσεις σε Νοσοκομειακά Εργαστήρια για την διάγνωση των Κλωστηριδίων**

2.6.1 Τοξινογόνος καλλιέργεια

2.6.2 Ανοσοενζυμική μέθοδος

2.6.3 Κυτταροκαλλιέργεια

## **Κεφάλαιο 3<sup>0</sup>**

### **3.1 Συνηθισμένα Κλωστηρίδια**

3.1.1 Clostridium tetani

3.1.2 Clostridium perfringens, welchii

3.1.3 Clostridium difficile

3.1.4 Clostridium botulinum

### **3.2 Τι προκαλεί στα ζώα**

3.2.1 Πρόβατα

3.2.2 Άλογα

3.2.3 Πτηνά

3.2.4 Άνθρωπος

### **3.3 Νοσήματα που προκαλούνται από Κλωστηρίδια**

3.3.1 Αεριογόνος γάγγραινα

3.3.2 Τροφική δηλητηρίαση

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

### ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΩΝ

#### 1.1 ΓΕΝΟΣ ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΑ

Το γένος των *Clostridium* που ανήκει στην οικογένεια *Bacilaceae* κατά Bergey περιλαμβάνει ραβδιόμορφα σπορογόνα βακτήρια. Στις καλλιέργειες όμως είναι δυνατόν να συναντώνται υπό διάφορες μορφές όπως υπό μορφή νηματίων, <<λεμονοειδών>> σωματείων και σχηματισμών ατρακτοειδών ή ροπαλοειδών. Χρωματίζονται θετικά κατά Gram, αλλά σε καλλιέργειες μεγαλύτερες των 24 ωρών τα περισσότερα είναι δυνατόν να αποχρωματιστούν και να εμφανίζονται μετέπειτα ως Gram αρνητικά βακτήρια (Holt, 2000). Τα *Clostridium* είναι αναερόβια και αναπτύσσονται μόνο υπό συνθήκες αναερόβιες με τη χρησιμοποίηση ειδικών μεθόδων. Μάλιστα για ορισμένα το οξυγόνο, ακόμη και σε ίχνη, δρα ως δηλητήριο και προλαμβάνει την ανάπτυξη του. Όλα τα είδη, όμως δεν έχουν την ίδιου βαθμού ευαισθησία στο οξυγόνο. Μερικά είδη είναι αυστηρά αναερόβια και δεν μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία οξυγόνου, ενώ άλλα είδη αναπτύσσονται, όπως το *Cl. tertium* και το *Cl. histolyticum* παρουσία μικρών ποσοτήτων οξυγόνου (μικροαερόφιλα).

Απαντώνται στο περιβάλλον με δύο μορφές:

- τις βλαστικές μορφές
- τους σπόρους.

Τα βλαστικά κύτταρα του γένους *Clostridium* (ως αναερόβια) θανατώνονται με έκθεση στον αέρα, ενώ οι σπόροι τους δεν επηρεάζονται από παρόμοιο περιβάλλον. Οι σπόροι δεν έχουν την δυνατότητα

πολλαπλασιασμού, σχηματίζονται όμως και έχουν την ικανότητα διατήρησης των βακτηρίων κάτω από αντίξοες συνθήκες. Δεν προκαλούν νόσο και κάτω από κατάλληλες συνθήκες (θερμοκρασίας, aw, pH κ.ά.) βλασταίνουν και σχηματίζουν τις βλαστικές μορφές του βακτηρίου. Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί στις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος ( υψηλή θερμοκρασία, έλλειψη θρεπτικών ουσιών, χαμηλές τιμές ενεργότητας νερού) (Hatheway, 1990).Επιζούν εύκολα των συνηθισμένων μεθόδων επεξεργασίας τροφίμων όπως π.χ. της παστερίωσης, ξήρανσης, αλάτισης. Οι σπόροι του γένους Clostridium έχουν σχήμα ωοειδές ή σφαιρικόκοκοί είναι κεντρικοί, τελικοί ή υποτελικοί. Η διάμετρος των σπόρων είναι συνήθως μεγαλύτερη της διαμέτρου του σώματος του βακτηριδίου και γι' αυτό τα Κλωστηρίδια παίρνουν ανάλογο σχήμα, από το οποίο προέρχεται και το όνομα του γένους (Κλωστηρ = άτρακτος, αδράχτι). Τα βακτήρια του γένους Clostridium χαρακτηρίζονται αρνητικά ως προς την καταλάση εκτός από ορισμένα είδη που εκκρίνουν μικροποσότητες του ενζύμου καταλάση. Το σχήμα των αποικιών Clostridium σε στερεά θρεπτικά υλικά ποικίλλει, πολλά δε είδη προκαλούν αιμόλυση καλλιεργούμενα σε αιματούχο άγαρ (Holt, 2000).

Σύμφωνα με το μεταβολισμό τους που είναι ζυμωτικός, διαχωρίζονται σε δύο ομάδες, τα σακχαρολυτικά Clostridia που ζυμώνουν τα σάκχαρα και τα πρωτεολυτικά, τα οποία αποικοδομούν τις πρωτεΐνες. Στην πρώτη περίπτωση σχηματίζονται κυρίως οξέα, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, και άλλα ενδιάμεσα προϊόντα τα οποία όμως δεν είναι δύσοσμα. Αντίθετα κατά την πρωτεόλυση σχηματίζονται δύσοσμα τελικά προϊόντα (H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub>, ινδόλη, σκατόλη) τα οποία κάνουν εμφανή την αλλοίωση με την οσμή. Τα σακχαρολυτικά Clostridia, εφόσον είναι τοξινογόνα θεωρούνται επικίνδυνα για τον άνθρωπο. Αυτό οφείλεται στο ότι εγκαθίστανται στο τρόφιμο και το μολύνουν με τοξίνη,



χωρίς να αλλοιώνουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τροφίμου, ώστε να το καταστήσουν οργανοληπτικά απορριπτέο στον καταναλωτή.

Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των *Clostridium* είναι η παραγωγή ισχυρών εξωτοξινών και ενζύμων. Ισχυρές εξωτοξίνες παράγουν τα *C.botulinum*, *C.tetani*, *C.perfringens*. Στις παραγόμενες εξωτοξίνες και ένζυμα περιλαμβάνονται λεκιθινάση, η κολλαγενάση, η υαλουρονίδαση, η δεσοξυριβονουκλεάση, η νευραμινιδάση και οι αιμολυσίνες. Όλες αυτές οι ουσίες είναι αντιγονικές. Αντισώματα παραγόμενα έναντι των τοξινών αυτών χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση των διάφορων ειδών *Clostridium* (Bergey's manual, 1974, Σκούφος, 2002).

Τα *Clostridia* βρίσκονται σε αφθονία στο έδαφος. Μερικά είδη *Clostridium* όπως (το *C.perfringens* και το *C. Sporogenes*), τα οποία φυσιολογικά ανευρίσκονται στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων, μετά τον θάνατο εισέρχονται στους ιστούς και με την συνεργασία άλλων αερόβιων μικροβίων (όπως Πρωτεϊς) προκαλούν σήψη των πτωμάτων. Τα κλωστηρίδια εκτός από το έδαφος, βρίσκονται στο νερό υπονόμων, στο γλυκό νερό και στο ίζημα θαλάσσιου νερού, σε προϊόντα ζώων και φυτών και στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων σαν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας.

Πολλά είδη, του γένους, είναι δυνητικά παθογόνα, μερικά εξαιρετικά παθογόνα και άλλα αβλαβή σαπροφυτικά. Ορισμένα είδη των *Clostridium* προκαλούν ειδικής φύσεως λοιμώξεις. Για παράδειγμα το *C.tetani* είναι το ειδικό αίτιο του τετάνου, το *C.botulinum* προκαλεί την αλλαντίαση, ενώ ως κλωστηρίδια της αεριογόνου γάγγραινας(αναερόβια μιονέκρωση) ενοχοποιούνται κυρίως τα *C.perfringens*, *C.novi* και το *C.septicum* (Holt,2000).

Η ταυτοποίηση των κυριότερων παθογόνων Clostridium, γίνεται βάσει των βιοχημικών ιδιοτήτων λαμβάνοντας υπόψιν και τα ακόλουθα:

- τη μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας του μικροοργανισμού.
- Τη μακροσκοπική παρατήρηση των αποικιών.
- Τον έλεγχο της κινητικότητας.
- Την αδρανοποίηση των τοξινών σε πειραματόζωα, μετά από εγχύσεις αντιτοξινών.
- Το σχηματισμό λιπαρών οξέων στο υπόστρωμα.
- Τον έλεγχο της παθογόνου δράσης σε πειραματόζωα.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι γενικά ευαίσθητη στην πενικιλίνη (G), στην ερυθρομυκίνη, στην τετρακυκλίνη, στη βανκομυκίνη και στα άλλα αντιμικροβιακά φάρμακα που είναι δραστικά στα αναερόβια μικρόβια όπως μετρονιδαζόλη, κλινδαμυκίνη και χλωραμφαινικόλη. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι το 50 % των απομονωμένων στελεχών στον άνθρωπο ανήκουν στο είδος *C.perfringens*.

Σύμφωνα με την τελευταία έκδοση του Bergey's Manual (2000) τα Clostridia διαιρούνται σε τέσσερις ομάδες με βάση τη θέση του σπόρου και την υδρόλυση της ζελατίνης. Μερικά είδη με ειδικές απαιτήσεις για την ανάπτυξη αποτελούν την πέμπτη ομάδα. Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 100 είδη Clostridia (Allen, Baron, 1991,) από τα οποία εκείνα που προκαλούν συχνότερα λοιμώξεις στον άνθρωπο αναφέρονται στον πίνακα 1.

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 1.</b>	
Είδη Clostridium που προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο <sup>1</sup>	
ΕΙΔΗ	Συχνότητα απομωνοσης <sup>2</sup>
C. perfringens	22,6
C. ramosum	12,2
C. innocuum	11,2
C. clostridiiforme	9,6
C. difficile	6,2
C. butyricum	4,3
C. cadaveris	4,0
C. bifermantans	3,0
C. sporogenes	3,0
C. septicum	2,9
C. tertium	2,4
Διάφορα γνωστά είδη	6,6
Μη αναγνωρίσιμα είδη	12,0

1: Από τους Allen, Baron τροποποιημένος (Allen, Baron, 1991).

2: ως 100% λαμβάνεται το σύνολο των κλωστηριδιακών λοιμώξεων.

Το γένος των Κλωστηριδίων περιλαμβάνει βακτηρίδια θετικά κατά GRAM, τα οποία είναι γενικώς υποχρεωτικά αναερόβια. Μερικά από αυτά μπορούν να αναπτυχθούν σε ελαττωμένη πυκνότητα οξυγόνου (μικροαερόφιλα). Όλα τα κλωστηρίδια είναι σπορογόνα. Η ιδιότητα αυτή επιτρέπει στα κλωστηρίδια να επιζούν σε δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως στο χώμα, το δέρμα κ.λπ. Βρίσκονται στο χώμα και τον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων ως σαπρόφυτα. Στο έδαφος προκαλούν διάσπαση φυτικών και ζωικών ουσιών. Μερικά είδη (όπως το κλωστηρίδιο το διαθλαστικό και το κλωστηρίδιο το σπορογόνο) τα οποία φυσιολογικώς βρίσκονται στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων, μετά τον θάνατο τους εισέρχονται στους ιστούς και με τη συνεργασία άλλων αεροβίων μικροβίων (όπως οι Πρωτεΐς) προκαλούν σήψη και καταστροφή των πτωμάτων.

Μερικά από τα κλωστηρίδια είναι παθογόνα για τον άνθρωπο υπό ορισμένες συνθήκες, όπως το **Κλωστηρίδιο της αλλαντιάσεως** (*Clostridium botulinum*) προκαλεί την αλλαντίαση, το **Κλωστηρίδιο του τετάνου** (*Clostridium tetani*) προκαλεί το τέτανο, το **Κλωστηρίδιο το διαθλαστικό** (*Clostridium perfringens* ή *welchii*) προκαλεί τροφικές δηλητηριάσεις και αεριογόνο γάγγραινα, το **Κλωστηρίδιο το σηπτικό** (*Clostridium septicum*), το **Κλωστηρίδιο το οιδηματογόνο** (*Clostridium oedematiens*) κ.α. είναι υπεύθυνα επίσης για αεριογόνο γάγγραινα. Το **Κλωστηρίδιο το δύσκολο** (*Clostridium difficile*) είναι αίτιο της ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας η οποία εμφανίζεται μετά τη θεραπεία με αντιβιοτικά.

## 1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Τα Κλωστηρίδια είναι συνήθως μεγάλα βακτηρίδια, μήκους 3-8μm και πλάτους 0.4-1.2μm που έχουν την ικανότητα να παράγουν σπόρους. Μορφολογικά λοιπόν διακρίνονται οι βλαστικές ( ή φυτικές ) μορφές και οι σπόροι αυτών.

Η βλαστική μορφή στα περισσότερα κλωστηρίδια έχουν σχήμα ευθείας ή κεκαμμένου βακτηριδίου, που ποικίλλει από κοκκοβακτηρίδιο μέχρι μακρύ νηματοειδές. Τα βακτηρίδια έχουν παράλληλες πλευρές και τα άκρα τους μπορεί να λεπτύνονται βαθμιαία, να είναι αποστρογγυλεμένα ή ορθογώνια. Μερικά είναι τόσο πολύμορφα που η ταυτοποίηση τους με βάση τα μορφολογικά κριτήρια είναι αδύνατη. Η μορφολογία ενός στελέχους μπορεί να μπορεί να παραλλάσει όχι μόνο στην ίδια καλλιέργεια αλλά και από καλλιέργεια σε καλλιέργεια. Εμφανίζονται μονήρη, σε ζεύγη ή σε αλυσίδες με ποικίλο μήκος. Σε μερικά είδη όπως *C.coccleatum* και *C.spiroforme*, αρκετά βακτηρίδια συνδέονται σε συμπαγείς ελικοειδείς και σπειροειδείς σχηματισμούς [Cato et al, 1986].

Τα περισσότερα είδη χρωματίζονται θετικά κατά Gram κατά τη διάρκεια του πρώιμου σταδίου ανάπτυξης. Ωστόσο, κάποια είδη (όπως τα *C.ramosum* και *C.clostridiforme*) σχεδόν πάντοτε εμφανίζονται ως Gram(-), μετά από 24ωρη επώαση. Μερικά είδη ( συμπεριλαμβανομένου του *C.tetani*) εμφανίζονται ως Gram(-) όταν έχουν αναπτυχθεί οι σπόροι. Σχεδόν όλα τα είδη είναι κινητά, με τη βοήθεια περιτριχων βλεφαρίδων (flagella). Τα μη κινητά είδη που απομονώνονται από κλινικά δείγματα, είναι τα *C.perfringens*, *C.ramosum* και *C.innocuum*.

Οι σπόροι των Κλωστηριδίων έχουν σχήμα που ποικίλει από σφαιρικό έως ωοειδές και εμφανίζονται με τη μορφή της διόγκωσης στο σώμα βακτηριδίου. Οι σπόροι αναπτύσσονται σε διάφορες θέσεις του μικροβιακού κυττάρου, ανάλογα με το είδος. Μπορεί να είναι τελικοί ( στο άκρο του βακτηριακού σώματος), υποτελικοί (σε μικρή

απόσταση από το άκρο), ή κεντρικοί, δίνοντας διάφορα σχήματα στα κλωστηρίδια. Έτσι παρατηρούνται μορφές σχήματος τύμπανου (*C.tetani*), λεμονιού (*C.novyi*, *C. Septicum*) κλπ.

Τα είδη *C.perfringens* και *C.butiricum* φέρουν έλυτρο [Λεγάκης και Χρηστακης, 1997, Onderdonk και Allen, 1995].

Τα Κλωστηρίδια είναι μεγάλα, ευθέα ή με ελαφρά κάμψη βακτηρίδια. Στις καλλιέργειες όμως είναι δυνατόν να ευρίσκονται υπό διάφορες μορφές όπως υπό μορφή νηματίων, λεμονοειδών σωματείων ή και ατρακτοειδών ή ροπαλοειδών σχηματισμών. Η διάμετρος των σπόρων είναι συνήθως μεγαλύτερη της διαμέτρου του σώματος του βακτηριδίου και γι' αυτό τα Κλωστηρίδια παίρνουν ανάλογο σχήμα. Από το σχήμα αυτό προέρχεται και το όνομα του γένους (Κλωστήρ = άτρακτος, αδράχτι).

### 1.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βιοχημικές ιδιότητες των Κλωστηριδίων είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στην ταυτοποίηση τους σε επίπεδο είδους. Αναφέρονται ακολούθως οι σπουδαιότερες από αυτές.

Η δοκιμή της καταλασης είναι σπάνια θετική ( και σ' αυτές τις περιπτώσεις είναι ασθενώς θετική). Ακόμη, επειδή τα κλωστηρίδια στερούνται συστήματος κυτοχρωμάτων, η δοκιμασία οξειδάσης είναι αρνητική. Μερικά κλωστηρίδια συνθέτουν δισμουταση του υπεροξειδικου ανιόντος. Τα είδη *Clostridium* συνήθως είναι είτε ζυμωτικά (σακχαρολυτικά), όπως τα *C.novyi*, *C.perfringens* και *C.septicum*, είτε πρωτεολυτικά, όπως τα *C. Hystoliticum* και *C.sporogenes*. Ο διαχωρισμός αυτός όμως δεν είναι απόλυτος. Κάποια είδη εμφανίζουν και τα δυο χαρακτηριστικά. Έτσι, το πρωτεολυτικό *C.sporogenes* εμφανίζει μικρή σακχαρολυτική δραστηριότητα, ενώ το σακχαρολυτικό *C.perfringens* είναι και ελαφρώς πρωτεολυτικό. Τέλος, υπάρχουν είδη που είναι αζυμωτικά και μη πρωτεολυτικά.

Αρκετά κλωστηρίδια παράγουν μια ποικιλία λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου( π.χ. οξεικο και βουτυρικό), όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει πεπτόνες εκχύλισμα ζύμης και γλυκόζη. Παράγουν επίσης αρκετά άλλα προϊόντα ζύμωσης, όπως ακετόνη, βουτανολη και άλλες αλκοόλες [ Λεγάκης και Χριστακης, 1997,Onderdonk and Allen, 1995].

Στους πίνακες Γ3 και Γ4 φαίνονται μερικές χαρακτηριστικές ιδιότητες καθώς και οι κυριότερες βιοχημικές αντιδράσεις αντίστοιχα, ειδών κλωστηριδίων που εμφανίζουν ιατρικό ενδιαφέρον.

Τα Κλωστηρίδια είναι αναερόβια και αναπτύσσονται μόνο υπό συνθήκες αναερόβιες με τη χρησιμοποίηση ειδικών μεθόδων. Όλα τα είδη δεν έχουν την ίδια ευαισθησία στο οξυγόνο. Μερικά είδη είναι αυστηρά αναερόβια και δεν μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία μικρών ποσοτήτων οξυγόνου.

Το σχήμα των αποικιών των Κλωστηριδίων ποικίλλει. Πολλά είδη προκαλούν αιμόλυση καλλιεργούμενα σε αιματούχο άγαρ.

Μερικά είδη έχουν σακχαρολυτικές ιδιότητες και άλλες πρωτεΐνολυτικές. Τα σακχαρολυτικά διασπούν διάφορα σάκχαρα και τα πρωτεΐνολυτικά ρευστοποιούν πήγμα ορού αίματος ή πήγμα γάλακτος.

#### 1.4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ

Παρά το γεγονός ότι η πλειονότητα των κλωστηριδίων είναι υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια, υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση από είδος σε είδος σχετικά με τη ικανότητα τους να αναπτύσσονται παρουσία οξυγόνου. Κάποια είδη, όπως τα *C.haemoliticum* και *C. novyi* τύπου Β είναι αυστηρά αναερόβια και αδυνατούν να αναπτυχθούν ακόμη και παρουσία ελάχιστου οξυγόνου ( $>0,05\%$ ). Άλλα είδη αντιθέτως είναι ανθεκτικά στον αέρα (*C.tertium*, *C.camis*, *C.histoliticum* και ορισμένα στελέχη του *C.perfringens*) και παρουσιάζουν περιορισμένη ανάπτυξη σε στερεά θρεπτικά υλικά, μετά από επώαση σε ατμόσφαιρα 5-10% CO<sub>2</sub>.

Βασικό θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια των κλωστηριδίων είναι το Αναερόβιο Αιματούχο Αγαρ (AAA), ενώ αναλόγως του είδους αναπτύσσονται και σε εκλεκτικά υγρά ή θρεπτικά υλικά. Ειδικότερα, για την απομόνωση του *C.difficile* χρησιμοποιούνται τα εκλεκτικά υλικά CCFA (Cycloserin Cefoxitin Fructose Agar) και CCEY (Cycloserin Cefoxitin Egg Yolk Agar). Στο AAA, μετά από επώαση 24-48 ωρών, τα κλωστηρίδια εμφανίζουν αποικίες συνήθως κυκλικές, με ομαλά, ακανόνιστα ή ριζοειδή χείλη, αδιαφανείς ή διαφανείς και με διάμετρο που ποικίλει (2-8 mm, ανάλογα με το είδος). Το χρώμα των αποικιών επίσης κυμαίνεται από άσπρο-γκρι μέχρι γκριζοκίτρινο. Τα *C. novyi* τύπου Α και Β, *C. tetani* και *C.septicum* εμφανίζουν ερπυσμό στο υλικό. Σε ότι αφορά τη δημιουργία αιμόλυσης, τα *C.sordelii*, *C.innocuum* και *C. novyi* τύπου D εμφανίζουν β-αιμόλυση, ενώ το *C.sporogenes* ψευδή αιμόλυση. Το *C.tetani* εμφανίζει α-αιμόλυση, η οποία με την πάροδο του χρόνου μετατρέπεται σε β-αιμόλυση, λόγω παραγωγής οξυγονοευαίσθητης αιμολυσίνης (τετανοσπασμίνη). Το *C. novyi* τύπου Α και Β δίνει αιμόλυση που επιτείνεται όταν τα τρυβλία τοποθετηθούν στο ψυγείο, καθώς οι υπεύθυνες για τη δημιουργία της αιμόλυσης β, γ και δ τοξίνες είναι



ψυχρολυσινες. Τέλος, το *C.perfringens* παράγει γύρω από τις αποικίες μια εσωτερική ζώνη ατελούς αιμόλυσης ( α τοξίνη). Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης των Κλωστηριδίων είναι 37<sup>0</sup>C και κατάλληλο Ph είναι το 7.0-7.4.

Κάτω από την υπεριώδη ακτινοβολία μεγάλου μήκους κύματος οι αποικίες του *C.difficile* στο CCEY αγαρ εκπέμπουν κιτρινοπράσινο φθορισμό. Παρομοίου χρώματος φθορισμό παράγουν και τα είδη *C.innocuum*, *C. novyi* τύπου A, *C.cadaveris* και *C.skatologenes*. [Λεγάκης και Χριστακης, 1997, Onderdonk and Allen, 1995].

**ΠΙΝΑΚΑΣ Γ3.**Χαρακτηριστικές ιδιότητες των κλινικά σημαντικών κλωστηριδίων [ Λεγάκης και Χρηστακης.1997].

<b>Είδος</b>	<b>Μορφολογία</b>	<b>Διάταξη</b>	<b>Σπόροι</b>	<b>Κινητικότητα</b>	<b>Φθορισμός</b>	<b>Αιμόλυση</b>
C.perfringens	4με8μm,ελυτρο,ε νιοτε Gram(-) )ανώμαλες επιφάνειες.	Μονήρες σωροί παράλληλ η διάταξη.	<b>Ω,Υ</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>	<b>β/α</b>
C.botulinum	4-6μm ποικιλομορφία Στη χρώση Gram.	Μονήρες, σωροί	<b>Ω,Υ/Τα</b>	<b>(+)</b>	<b>(-)</b>	<b>β</b>
C.tetani	4-6μm Gram(-) σε παλιές καλλιέργειες πλήκτρα τυμπάνου.	μονήρες	<b>Σ,Τ</b>	<b>(+)</b>	<b>(-)</b>	<b>β</b>
C.difficile	6-8μm Gram(-) σε παλιές καλλιέργειες.	μονήρες	<b>Ω,Η</b>	<b>(+)</b>	<b>(+)</b>	<b>(-)</b>
C.amosum	2-5 μm συχνά Gram (-).	Ζεύγη, αλύσεις σχηματισμ οίV η Υμορφής.	<b>Σ/Ω,Τ</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>
C.sporogenes	3-6μm Gram(-) σε παλιές καλλιέργειες νηματοειδείς μορφές.	Μονήρες, ζεύγη ομάδες	<b>Ω,Υ</b>	<b>(+)</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>
C.cadaveris	2-2,5μm λεπτό βακτηρίδιο.	μονήρες	<b>Ω,Τ</b>	<b>(+)</b>	<b>(+)</b>	<b>(-)</b>

Είδος	Μορφολογία	Διάταξη	Σπόροι	Κινητικότητα	Φθορισμός	Αιμόλυση
C.novyi A	0.5-1.6μm Gram(-)σε παλιές καλλιέργειες	μονήρες, ζεύγη, αλύσεις	<b>Ω,Υ</b>	<b>(+)</b>	<b>(+)</b>	<b>B</b>
C.novyi B	1,1-2,5μm, Gram(-) σε παλιές καλλιέργειες	μονήρες, ζεύγη, αλύσεις	<b>Ω,Υ</b>	<b>(+)</b>	<b>(-)</b>	<b>B</b>
C.septicu m	2-6μm Gram(-) ) μορφές ατρακτοειδές/ν ηματοειδείς	μονήρες, ζεύγη, αλύσεις	<b>Ω,Υ</b>	<b>(+)</b>	<b>(-)</b>	<b>B</b>
C.sordellii	3,5-6μm	μονήρες	<b>Ω,Υ/Κ</b>	<b>(+)</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)/β</b>
C.innocuu m	2-6μm συχνά Gram(-)	μονήρες	<b>Ω,Τ</b>	<b>(-)</b>	<b>(+)</b>	<b>(-)/β</b>
C.butyricu m	3-4μm έλυτρο.	μονήρες, ζεύγη το ένα μετά το άλλο.	<b>Ω,Υ</b>	<b>(+)</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>

**Υπόμνημα:** 1. Ω:ωοειδής, Υ: υποτελικός, Τ:τελικός, Σ: σφαιρικός, Κ:κεντρικός.

2. (-): ακίνητο, (+): κινητό

3. (-): απουσία αιμόλυσης, α: α-αιμόλυση, β: β-αιμόλυση.

4. (-) :αρνητική αντίδραση, (+) θετική αντίδραση.

**ΠΙΝΑΚΑΣ Γ4** : Οι κυριότερες βιοχημικές αντιδράσεις των κλινικά σημαντικών κλωστηριδίων [Λεγάκης και Χρηστακης.1997].

<b>ΖΥΜΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ</b>						
<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<b>ΓΛΥΚΟΖΗ</b>	<b>ΜΑΝΙΤΟΛΗ</b>	<b>ΛΑΚΤΟΖΗ</b>	<b>ΣΟΥΚΡΟΖΗ</b>	<b>ΜΑΛΤΟΖΗ</b>	<b>ΣΑΛΙΚΙΝΗ</b>
C.perfringens	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
C.botulinum	(+)	(-)	(-)	Π	Π	(-)
C.tetani	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C.difficile	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
C.amosum	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
C.sporogenes	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	Π
C.cadaveris	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C.novyi A	(+)	(-)	(-)	(-)	Π	(-)
C.novyi B	(+)	(-)	(-)	(-)	Π	(-)
C.septicum	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
C.sordellii	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
C.innocuum	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
C.butyricum	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

ΥΠΟΜΝΗΜΑ: (-):αρνητική αντίδραση,(+):θετική αντίδραση, Π:ποικίλη αντίδραση

<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<b>Ανάγωγη νιτρικών</b>	<b>Παραγωγή ινδολης</b>	<b>Υδρόλυση εσκουλινης</b>	<b>Υδρόλυση ζελατινης</b>	<b>Πέψη γάλακτος</b>
C.perfringens	Π	(-)	Π	(+)	(+)
C.botulinum	(-)	(-)	Π	(+)	Π
C.tetani	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
C.difficile	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
C.ramosum	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
C.sporogenes	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
C.cadaveris	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
C.novyi A	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
C.novyi B	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
C.septicum	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
C.sordellii	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
C.innocuum	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
C.butyricum	Π	(-)	(+)	(-)	(-)

Υπόμνημα: (-):αρνητική αντίδραση,(+):θετική αντίδραση Π:ποικιλη αντίδραση.

## 1.5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Αν και τα είδη των κλωστηριδίων βρίσκονται παντού στη φύση, οι κύριες δεξαμενές τους είναι το έδαφος και ο πεπτικός σωλήνας αρκετών ζώων και του ανθρώπου [Smith and Williams,1984].

Τα είδη που συχνότερα απομονώνονται από το έδαφος είναι τα *C.subterminale*, *C.sordellii*, *C.sporogenes*, *C.indolis*, *C.bifermentans*, *C.mangenotii*, *C.perfringens* [Smith,1975]. Άλλα κλωστηρίδια, που έχουν επίσης βρεθεί σε δείγματα εδάφους αν και σπανιότερα, είναι τα *C.botulinum*, *C.tetani* [Smith,1978]. Ειδικά στην περίπτωση του *C.perfringens* η εκτεταμένη του διασπορά στο έδαφος συνεπάγεται τη συχνή του παρουσία σε επιφάνειες και αντικείμενα που εκτίθενται στη σκόνη, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων [Smith and William, 1984]. Η ημερήσια λήψη πάντως από τον άνθρωπο του *C.perfringens* με την τροφή είναι μικρή και δεν ξεπερνά τα 500 βακτήρια [Smith and William,1984].

Κλωστηρίδια απομονώνονται συχνά από τα κόπρανα νεογνών, κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας της ζωής τους, ιδιαίτερα σε όσα δεν θηλάζουν και τρέφονται με τεχνητό γάλα. Κόπρανα βρεφών ηλικίας 6-20 μηνών περιέχουν σχεδόν το ίδιο μικροβιακό φορτίο *C.perfringens* με τους ενήλικους [Stark and Lee, 1982]. Επίσης, το *C.difficile* ανευρίσκεται συχνότατα στα κόπρανα βρεφών, αν και απομονώνεται σπάνια από ασυμπτωματικούς ενήλικες σε συχνότητα που δεν ξεπερνά το 3-4% [George and Finegold,1985]. Αρκετά ακόμη είδη κλωστηριδίων, όπως τα *C.innocuum*, *C.ramosum*, *C.paraputrificum*, *C.sporogenes*, *C.tertium*, *C.bifermentans* και *C.butyricum*, εδράζονται στο κατώτερο τμήμα του εντερικού σωλήνα του ανθρώπου, αποτελούντα μέλη της φυσιολογικής του χλωρίδας. Με λίγες εξαιρέσεις, τα περισσότερα είδη αποτελούν σαπρόφυτα.

## 2<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ

### ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

#### 2.1 Εργαστηριακή διάγνωση του Clostridium.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση του Clostridium είναι :

1. Μικροσκοπική εξέταση του δείγματος με χρώση Gram.
2. Καλλιέργεια, απομόνωση και ταυτοποίηση του Clostridium από δείγματα,σηπτικές φλεγμονές και κόπρανα.
3. Ανίχνευση της τοξίνης.

#### 2.1.2 Μέθοδος ενσωματώσεως

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται σε δυο φάσεις :

##### **1. Φάση αριθμώσεως των θειοαναγωγικών Clostridium :**

Από τις διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του τροφίμου γίνεται ενοφθαλμισμός σε διπλή σειρά τρυβλίων με όγκο ενοφθαλμίσματος 1 ml. Το ενοφθάμισμα με κατάλληλες κινήσεις ενσωματώνεται σε 15-20 ml ρευστού υποστρώματος Sulfite-Polymyxin-Sulfadiazine Agar ή Oleandomy Cin-Polymyxin-Sulfadiazine Agar ή Tryptose-Sulfite-Cycloserine Agar θερμοκρασίας 45οC περίπου. Μετά τη στερεοποίηση του υποστρώματος δημιουργείται στο τρυβλίο στοιβάδα επικάλυψης με την προσθήκη ποσότητας 5-8 ml από το ίδιο υπόστρωμα. Γίνεται επώαση στους 37οC για 24 ώρες αναεροβίως.

##### **Ανάγνωση αποτελέσματος:**

Τα θειοαναγωγικά Clostridia ανάγουν τις υποθειώδεις ή μεταδιθειώδεις ενώσεις και σχηματίζουν μαύρες αποικίες. Στο υπόστρωμα TSC agar, εφόσον έχει ενσωματωθεί λέκιθος αυγού, ορισμένες αποικίες παρουσιάζουν επιπλέον και την αντίδραση της λεκιθινάσης.

## 2. Φάση ταυτοποίησης και αρίθμησης του *Clostridium*:

Από κάθε τρυβλίο της πρώτης φάσης το οποίο αριθμήθηκε, επιλέγεται αριθμός αποικιών ίσος με την τετραγωνική ρίζα του συνόλου τους ή όλες οι αποικίες εφόσον ο αριθμός τους είναι μικρότερος από 10, ενοφθαλμίζονται σε υπόστρωμα Cooked Meat Medium ή σε ζωμό Thioglycolate, επωάζονται αναεροβίως στους 37°C για 24 ώρες και καθαροποιούνται σε ένα από τα στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την αρίθμηση των θειοαναγωγικών *Clostridium*. Τέλος μεταφέρονται πάλι σε υπόστρωμα Cooked Meat Medium ή σε ζωμό Thioglycolate για να ταυτοποιηθούν με βάση τα παρακάτω κριτήρια (Hall et al., 1969,- Bergey's Manual 1974):

### • Μορφολογία:

*Clostridia* θετικά κατά Gram, διαστάσεων 0,9–1,3 x 3-9 μη αμβλέα ορθογώνια άκρα, σπόροι (εφόσον υπάρχουν), ωοειδείς, μη παραμορφωτικοί, παραπολικοί.

• Παραγωγή υδρόθειου (H <sub>2</sub> S)	+
• Παραγωγή λεκιθινάσης	+
• Ζύμωση της λακτόζης	+
• Αναεροβίωση	+
• Κινητικότητα	—
• Αναγωγή των νιτρικών	±
• Αναστολή θράσεως της λεκιθινάσης	+

Από τα *Clostridia* που παράγουν λεκιθινάση μόνο το *C.perfringens* έχει την ικανότητα ζυμώσεως της λακτόζης. Η ικανότητα αναγωγής των νιτρικών αλάτων δεν αποτελεί σταθερό χαρακτηριστικό (Smith και Holdeman 1968, Hall και al., 1969).

### Έκφραση τελικού αποτελέσματος:

Ο συνολικός αριθμός του *C.perfringens* υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των αποικιών που χαρακτηρίστηκαν ως θειοαναγωγικές επί το ποσοστό των αποικιών οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως *C.perfringens* και το γινόμενο επί το συντελεστή αραιώσεως.



### **2.1.3 Μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης**

Ορισμένοι ερευνητές βρίσκουν πιο αποτελεσματική τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης αντί της μεθόδου της ενσωμάτωσης. Χρησιμοποιούνται τα ίδια στερεά υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιούνται και στη μέθοδο της ενσωμάτωσης, μόνο που στην επιφάνεια τους γίνεται εξάπλωση 0,2 ml από τις κατάλληλες αραιώσεις του δείγματος με τη βοήθεια γυάλινης κεκαμμένης ράβδου. Στη συνέχεια αφού απορροφηθεί το ενοφθαλμισμα γίνεται επιστοιβάδευση ποσότητας 5-8 ml από το ίδιο το υπόστρωμα για να σχηματισθεί στοιβάδα επικάλυψης. Η αρίθμηση και η ταυτοποίηση του *C.perfringens* γίνεται όπως και στη μέθοδο της ενσωμάτωσης.

### **2.1.4 Μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων**

Η μέθοδος προορίζεται για δείγματα με σχετικά χαμηλά επίπεδα μόλυνσης με *C.perfringens*. Η μέθοδος γίνεται σε δυο φάσεις :

- **Προκαταρκτική δοκιμή (εμπλουτιστική φάση):**

Από τις κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιούνται τρεις ή πέντε για τον ενοφθαλμισμό τριπλής ή πενταπλής σειράς σωλήνων οι οποίοι περιέχουν Cooked Meat Medium ή Liquid Sulfite Cycloserine Medium. Όταν πρόκειται να ενοφθαλμιστούν 10 ml (1gr) από την αραιώση 10<sup>-1</sup> στερεού δείγματος ή 10 ml υγρού δείγματος, τότε η πρώτη σειρά σωλήνων περιέχει 10 ml υπόστρωμα διπλής συγκέντρωσης. Στις υπόλοιπες σειρές χρησιμοποιούνται υποστρώματα κανονικής συγκέντρωσης, ενώ ο όγκος του ενοφθαλμίσματος είναι 1 ml από τις αντίστοιχες αραιώσεις.

Οι σωλήνες που περιέχουν το υπόστρωμα, πριν τον ενοφθαλμισμό, θερμαίνονται για χρόνο 10 λεπτών σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 100°C και αμέσως μετά ψύχονται σε κρύο νερό, προκειμένου να απομακρυνθεί ο αέρας που είναι διαλυμένος στο υπόστρωμα. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 24 ώρες αναεροβίως.

### **Ανάγνωση αποτελέσματος:**

Στους σωλήνες που περιέχουν το Cooked Meat Medium, η ανάπτυξη υποδηλώνεται με το θόλωμα του υποστρώματος χωρίς να επέλθει μεταβολή του χρώματος. Αντίθετα στους σωλήνες που περιέχουν το LSC Medium η ανάπτυξη υποδηλώνεται με το σχηματισμό μαύρου χρώματος. Οι σωλήνες που δεν παρουσιάζουν μαύρο χρώμα στο πρώτο 24ωρο παραμένουν 24 επιπλέον ώρες στην επώαση.

### **• Επιβεβαιωτική δοκιμή:**

Από τους σωλήνες της προκαταρκτικής δοκιμής που παρουσιάζουν ανάπτυξη ή μαύρο χρώμα, γίνεται σπορά, με τη βοήθεια μεταλλικού κρίκου, σε ένα από τα στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των θειοαναγωγικών *Clostridium*. Γίνεται επιστοιβάδευση μικρής ποσότητας από το ίδιο υπόστρωμα. Από κάθε τρυβλίο επιλέγονται 1-2 τυπικές αποικίες και υποβάλλονται σε ταυτοποίηση για *C.perfringens* με την διενέργεια βιοχημικών δοκιμασιών. Θετική αποικία υποδηλώνει θετικότητα του αντίστοιχου τρυβλίου και συνεπώς του σωλήνα της αντίστοιχης αραιώσης.

## **2.2 Ταυτοποίηση**

### **2.2.1 Προκαταρκτική ταυτοποίηση**

Στηρίζεται σε τεχνικές που δίνουν αποτέλεσμα σε λίγες ώρες. Στις τεχνικές αυτές ανήκουν: η μακροσκοπική εξέταση του κλινικού δείγματος, η μορφολογία των αποικιών, οι καλλιεργητικοί χαρακτήρες, η χρώση Gram των αποικιών, η ευαισθησία με την τεχνική των δίσκων και ένας μικρός αριθμός βιοχημικών δοκιμασιών.

### **2.2.2 Αντιβιογράμμα (ευαισθησία με την τεχνική δίσκων)**

Σε εμπλουτισμένο θειογλυκολικό ζυμό πραγματοποιείται ανάπτυξη των *Clostridium* κυρίως του *C.perfringens*. Με βαμβακοφόρο στυλεό λαμβάνεται δείγμα καλά αναπτυγμένης καλλιέργειας και επιστρώνεται ομοιόμορφα προς τρεις διαφορετικές κατευθύνσεις σε τρυβλίο που έχει ως υπόστρωμα το αιματούχο Brucella Agar. Το αντιβιογράμμα περιλαμβάνει δίσκους κολιστίνης (10 mg), πενικιλίνης (2 U) και βανκομυκίνης (5 mgr). Μετά την τοποθέτηση του αντιβιοτικού οι καλλιέργειες τοποθετούνται σε αναερόβιο περιβάλλον για 48 ώρες.

Μετά την πάροδο των 48 ωρών επώασης γίνεται ο προσδιορισμός της διαμέτρου της ζώνης αναστολής. Διάμετρος μικρότερη των 10mm λαμβάνεται ως αντοχή του *Clostridium* στο αντιβιοτικό, ίση ή μεγαλύτερη από 10mm λαμβάνεται ως ευαισθησία. Η ευαισθησία που παρουσιάζουν κλωστηρίδια με την τεχνική των δίσκων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα :

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 3.</b>			
<b>Αντιβιοτικά</b>			
	<b>Κολιστινη</b>	<b>Πενικιλίνη</b>	<b>Βανκομυκίνη</b>
<b>C.perfringens (και είδη Clostridium που παράγουν τοξίνη - α)</b>	<b>A</b>	<b>EA</b>	<b>Δ</b>

**A** : ανθεκτικό (δια < 10mm)

**EA** : συνήθως ευαίσθητο και ορισμένα στελέχη ανθεκτικά

**Δ** : διάφορη αντίδραση.

### **2.2.3 Βιοχημικές δοκιμασίες**

Οι καλλιέργειες των *Clostridium* που εμφανίζουν χαρακτηριστική αντίσταση στο αντιβιοτικό κολιστίνη, κατά την εκτέλεση της ευαισθησίας με την τεχνική των δίσκων, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες με βάση την παραγωγή λεκιθινάσης.

Η παραγωγή λεκιθινάσης διαπιστώνεται με την καλλιέργεια των εξεταζόμενων κλωστηριδίων σε θρεπτικό υλικό που περιέχει αυγό. Σχηματισμός θολερότητας περί των αποικιών δηλώνει θετικότητα στην παραγωγή λεκιθινάσης. Στη συνέχεια τα κλωστηρίδια που παράγουν λεκιθινάση διαχωρίζονται σε δύο υποομάδες. Στην πρώτη υποομάδα η παραγωγή της λεκιθινάσης αναστέλλεται παρουσία αντιορού της α-τοξίνης του *C.perfringens* (στην υποομάδα ανήκουν τα *C.perfringens*, *C.barati* (*paraperfringens*), *C.bifermentans*, *C.Sordellii*). Στη δεύτερη υποομάδα η παραγωγή λεκιθινάσης δεν αναστέλλεται (στην υποομάδα ανήκουν τα: *C.botulinum*(A-F), *C.sporogenes*, *C.oedematiens*). Η αναστολή της παραγωγής λεκιθινάσης διαπιστώνεται με την αντίδραση Nagler.

Στον πίνακα αναφέρεται ο διαχωρισμός των *Clostridium* που δίνουν θετική την αντίδραση Nagler με βάση συγκεκριμένες βιοχημικές αντιδράσεις:

<b>Πίνακας 4 ΕΙΔΗ CLOSTRIDIUM</b>				
ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ	<i>C.perfringens</i>	<i>C.barati</i>	<i>C.bifermantans</i>	<i>C.sordellii</i>
Κινητικότητα	-		+	+
Ζύμωση λακτόζης	+		-	-
Ρευστοποίηση ζελατίνης	+		+	+
Παραγωγή ουρεασης	- +		-	+

+ Θετική αντίδραση.

- Αρνητική αντίδραση.

± Τα περισσότερα στελέχη δίνουν αρνητική αντίδραση.

Λόγω του γεγονότος ότι το *C.barati* απομονώνεται σπανιότατα σε εξεταζόμενα δείγματα, όταν το κλωστηρίδιο χαρακτηρίζεται ως ακίνητο και ζυμώνει την λακτόζη ταυτοποιείται σαν *C.perfringens*

#### **2.2.4 Κύρια ταυτοποίηση**

Η ταυτοποίηση των *Clostridium* θα στηριχθεί στην Gram χρώση των παρασκευασμάτων των αναερόβιων αποικιών, στους μορφολογικούς χαρακτήρες των αποικιών, στα εκλεκτικά και μη θρεπτικά υλικά, στις καλλιεργητικές ιδιότητες των αποικιών, στον έλεγχο των τελικών μεταβολικών προϊόντων και στην βιοχημική ταυτοποίηση.

#### **2.2.4.1 Έλεγχος των τελικών μεταβολικών προϊόντων**

Από τις διάφορες μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση αναερόβιων μικροβίων με τον έλεγχο των τελικών μεταβολικών προϊόντων, μόνο η αέρια υγρή χρωματογραφία έχει καθιερωθεί και χρησιμοποιείται σήμερα σε πολλά κλινικά εργαστήρια.

Αρχή λειτουργίας της αέριας υγρής χρωματογραφίας :

Η συσκευή αποτελείται :

- A. Από τη στήλη χρωματογραφίας
- B. Από τον ανιχνευτή
- Γ. Από τον καταγραφέα

Στην αέρια υγρή χρωματογραφία η κινητή φάση είναι αέρια και η στάσιμη φάση είναι υγρή. Το δείγμα εξαερώνεται στην υψηλή θερμοκρασία που υπάρχει στο σημείο εξαγωγής και παρασύρεται κατά μήκος της στήλης με τη βοήθεια ενός αερίου αδρανούς φορέα όπως το N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, ή He. Στο τέλος της στήλης ελέγχονται και αναγνωρίζονται τα διάφορα συστατικά του δείγματος. Ο διαχωρισμός των διαφορετικών τελικών μεταβολικών προϊόντων του δείγματος στηρίζεται στη διαφορά κατανομής των διαφορετικών ουσιών μεταξύ της κινητής αέριας φάσης και της στάσιμης υγρής φάσης.

#### **2.2.4.2 Βιοχημική ταυτοποίηση**

Πραγματοποιείται ένας μεγάλος αριθμός βιοχημικών δοκιμών για την ταυτοποίηση των αναερόβιων βακτηρίων. Μετά την εκτέλεση όλων των βιοχημικών δοκιμών, πρέπει να γίνεται ανακαλλιέργεια σε εμπλουτισμένο ΒΗΙΑ, από το αρχικό καλλιέργημα, για αναερόβια επώαση και εμβολιασμός σε αιματούχο άγαρ σε αερόβια επώαση (για έλεγχο καθαριότητας και αναεροβίωσης αντίστοιχα. Όταν αυτές οι δεύτερες καλλιέργειες δεν δείξουν επιμόλυνση τότε αξιολογούνται τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών.

### **2.2.5 Νέες μέθοδοι ταυτοποίησης των Clostridium κυρίως του C.perfringens.**

Οι νέες μέθοδοι ταυτοποίησης του *C. perfringens* είναι οι εξής:

- **Χρήση (MUP) και (ONPG).**

Οι Abcock και Saint, το 2001, αναφέρουν τη χρησιμοποίηση της 4-μεθυλυμπελλιφερικής φωσφατάσης (MUP) και την ορθο-νιτροφενιλ-β-γαλακτοπυρανοσόλης (ONPG) για την ταυτοποίηση του *C.perfringens*.

Πρόκειται για τεχνική ρευστής δοκιμασίας, που περιέχει τόσο την MUP όσο και την ONPG και θεωρήθηκε στην ερευνά τους ως μια εναλλακτική μέθοδος υψηλής ευαισθησίας για την ταυτοποίηση του *C.perfringens* μειώνοντας τον χρόνο επώασης από 48 ώρες, που γενικά κυριαρχεί στις περισσότερες μεθόδους απομόνωσης του βακτηρίου, στις 4 ώρες. Η μέθοδος είναι απλή, δεν χρειάζεται αναερόβιες συνθήκες και τα αντιδραστήρια της έχουν μεγάλο χρόνο διάρκειας.

- **Υβριδισμός νουκλεϊνικών οξέων (PCR) (Buogo et al., 1995).**

Πρόκειται για μια σύγχρονη μέθοδο της μοριακής βιολογίας για τον προσδιορισμό των υπεύθυνων γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή των παθογόνων για τον άνθρωπο και τα ζώα τοξινών όλων των τύπων του *C.perfringens*, με τη χρήση DNA ή RNA ανιχνευτών (probes).

Κυρίως η εφαρμογή της PCR χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του γονιδίου της α-τοξίνης (plc) και του γονιδίου της εντεροτοξίνης (cpe).

- **Αντιγόνα.**

Οι μέθοδοι για την ανίχνευση ειδικών αντιγόνων είναι παρόμοιες εκείνων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων. Αντιγόνα, όπως πρωτεΐνες 57 του κυτταρικού τοιχώματος, έλυτρο, εξωτοξίνες φαίνεται ότι έχουν κάποιο ρόλο στις μελλοντικές διαγνωστικές δοκιμασίες.

- Τεχνικές της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (pfge).

Ο Carard και οι συνεργάτες του, χρησιμοποίησαν τις τεχνικές της PFGE και χαρτογράφησης των γονιδίων, για να ερευνήσουν την ετερογένεια του γονιδιώματος των διαφορετικών στελεχών του *C.perfringens*, και τη σχέση τους με την παθογένεια του κάθε στελέχους.

### **2.2.6 Συστήματα επώασης αναερόβιων καλλιεργειών**

Τα αναερόβια μικρόβια για την ανάπτυξή τους, χρειάζονται, εκτός από τα κατάλληλα θρεπτικά υλικά :

- 1) Χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (eh) και
- 2) Μικρή συγκέντρωση οξυγόνου.

Το χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό δημιουργείται με την παρουσία αναγωγικών ουσιών στα θρεπτικά υλικά αναερόβιων μικροβίων και μικρή έως ελάχιστη συγκέντρωση οξυγόνου, με τη βοήθεια των συστημάτων επώασης αναερόβιων καλλιεργειών:

1. Αναερόβια φιάλη (anaerobic jar)
2. Αναερόβιο σύστημα μιας χρήσης (φάκελοι bio-bag)
3. Αναερόβιος θάλαμος (anaerobic glove box)
4. Αναερόβιος περιστρεφόμενος σωλήνας (anaerobic roll tube)





**Εικ.1.**Αναερόβιο σύστημα μιας χρήσης( anaerobic jar)



**Εικ.2.**Αναερόβιος θάλαμος (anaerobic glove box)

## **2.3. Υλικά και μέθοδοι απομόνωσης για τα είδη Clostridium.**

### **2.3.1 Απαιτούμενα υλικά**

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γένους *Clostridium spp* είναι τα παρακάτω :

1. Υγρό ομογενοποίησης του δείγματος.
2. Σιφώνια γυάλινα ή πλαστικά μιας χρήσης βαθμολογημένα για μικροβιολογική χρήση και χωρητικότητα από 1ml έως 11 ml.
3. Γυάλινοι σωλήνες χωρητικότητας 10ml.
4. Πώματα από υδρόφοβο βαμβάκι για γυάλινους σωλήνες.
5. Γυάλινα σωληνάκια Durham.
6. Αποστειρωμένες μεταλλικές λαβίδες.
7. Μεταλλικά στατό για γυάλινους σωλήνες.
8. Στείρες ευρύστομες φιάλες ή στείρα ποτήρια ζέσεως.
9. Ζυγός ακριβείας (Mark BEL ENGINEERING).
10. Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη πλάκα RCT basic (ΚΙΚΑ LABORTECHNIK).
11. Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (varipette 10-100μl και 100-1000μl).
12. Πλαστικά ρύγχη μιας χρήσης αποστειρωμένα, κίτρινα 10-100μl και μπλέ 100-1000μl για τις παραπάνω πιπέτες.
13. Φυγόκεντρος.
14. Υδατόλουτρο.
15. Ξηρός κλίβανος.
16. Αυτόκαυστο Sterilizer SE 510 (V yamato).
17. Lactose – Sulfite Medium broth (Y.9)

Χρησιμοποιήθηκαν ψυγεία 4°C και καταψύκτες -20°C για την διατήρηση των διαφόρων αντιδραστηρίων και δειγμάτων, επιτραπέζια χρονόμετρα για την τήρηση του χρόνου, συσκευή παροχής απεσταγμένου νερού και συσκευή απιονισμένου νερού και διάφορα γυάλινα σκεύη.

### **2.3.2 Μέθοδοι απομόνωσης και ταυτοποίησης για τα είδη Clostridium ( C.perfringens ):**

Η ερευνητική ομάδα για την καταμέτρηση του είδους *C. perfringens* έκανε χρήση του νέου θρεπτικού υλικού, του Lactose – Sulfite Medium (Y.9) (L.S broth – (ISO: 1997), το οποίο είναι υπερεκλεκτικό για την απομόνωση του *C.perfringens*, δίνοντας νέα ώθηση στους επιδημιολογικές μελέτες και στην ευχερέστερη ταυτοποίηση του. Σε παρόμοιες ερευνητικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε το ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα (Araujo et al., 2003).

Ο L.S broth δίνει τη δυνατότητα να προσδιορίζεται έστω και ελάχιστος αριθμός βλαστικών ή σπορογόνων μορφών του *C. perfringens* στα εξεταζόμενα δείγματα. Σε αυτό συνηγορεί η ελαχιστοποίηση του χρόνου που απαιτείται για την ανάγνωση του αποτελέσματος. Επιτρέπει, δε , τον εκλεκτικό διαχωρισμό του είδους *C. perfringens* από τα άλλα είδη *Clostridium spp.*

Από κάθε δείγμα κοπράνων λαμβάνεται αντιπροσωπευτικά μια ποσότητα του 1 g και μεταφέρεται σε σωλήνα που περιέχει 9 ml L.S. broth ( $10^{-1}$  αραιώση). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται δεκαδικές αραιώσεις σε σωλήνες που περιέχουν 9 ml L.S broth. (μέχρι τη  $10^{-3}$  αραιώση). Πραγματοποιείται στους 80°C για 20 λεπτά, διαδικασία που αφορά την απομόνωση σπόρων στο δείγμα. Στη συνέχεια όλοι οι σωλήνες τοποθετούνται σε μεταλλικό στατό και επωάζονται αερόβια στους 46°C για 24-76 h σε υδατόλουτρο.

Για την εξαγωγή του αποτελέσματος εκτιμούνται για κάθε αραίωση δείγματος σε υλικό L.S. broth οι εξής χαρακτήρες :

**Θόλωση:** Αναγνωρίζεται από την απώλεια στους διαύγειας του θρεπτικού υλικού, λόγω ζύμωσης στους λακτόζης.

**Παραγωγή H<sub>2</sub>S:** Αναγνωρίζεται με την ύπαρξη μαύρου χρώματος στον πυθμένα του γυάλινου σωλήνα ή σε όλη τη μάζα του υγρού λόγω παραγωγής H<sub>2</sub>S.

**Παραγωγή αερίου:** Αναγνωρίζεται με την ύπαρξη φυσαλίδων στο εσωτερικό του σωληνάριου Durham και απώθηση αυτού στην επιφάνεια του υγρού κατά τη διάρκεια στους ζύμωσης στους λακτόζης.

**Σχηματισμός ιζήματος:** Αναγνωρίζεται με την εμφάνιση ιζήματος στον πυθμένα του γυάλινου σωλήνα.

Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία 46°C για τον διαχωρισμό από άλλα βακτήρια που δίνουν στους την αντίδραση στους ζύμωσης στους λακτόζης θετική.

Η κάθε αραίωση του εξεταζόμενου δείγματος σε υλικό L.S. κρίνεται θετική ως στους την ύπαρξη στελεχών του είδους *C. perfringens* αν συνυπάρχει θολερότητα, παραγωγή H<sub>2</sub>S, σχηματισμός αερίου και σχηματισμός ιζήματος. Το ίδιο ισχύει και για την ανάδειξη θετικού ή όχι αποτελέσματος για την ύπαρξη σπόρων στο εξεταζόμενο δείγμα.

Στη συνέχεια, από σωλήνες με υλικό L.S broth οι οποίοι κρίνονται θετικοί με τουλάχιστον πάνω από δύο χαρακτηριστικά θετικότητας, λαμβάνεται 1 ml του ομογενοποιημένου δείγματος μέσα σε άδειο τρυβλίο και γίνεται προσθήκη 15–20 ml λειωμένου TSI agar. Επιπλέον γίνεται προσθήκη στους στρώματος 10 ml λειωμένου TSI agar και στη συνέχεια το θρεπτικό υπόστρωμα αφήνεται για στερεοποίηση ακολούθως το κάθε τρυβλίο επωάζεται αναερόβια στους 37°C για 24-36 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιείται καταμέτρηση των μαύρων αναπτυσθέντων αποικιών.

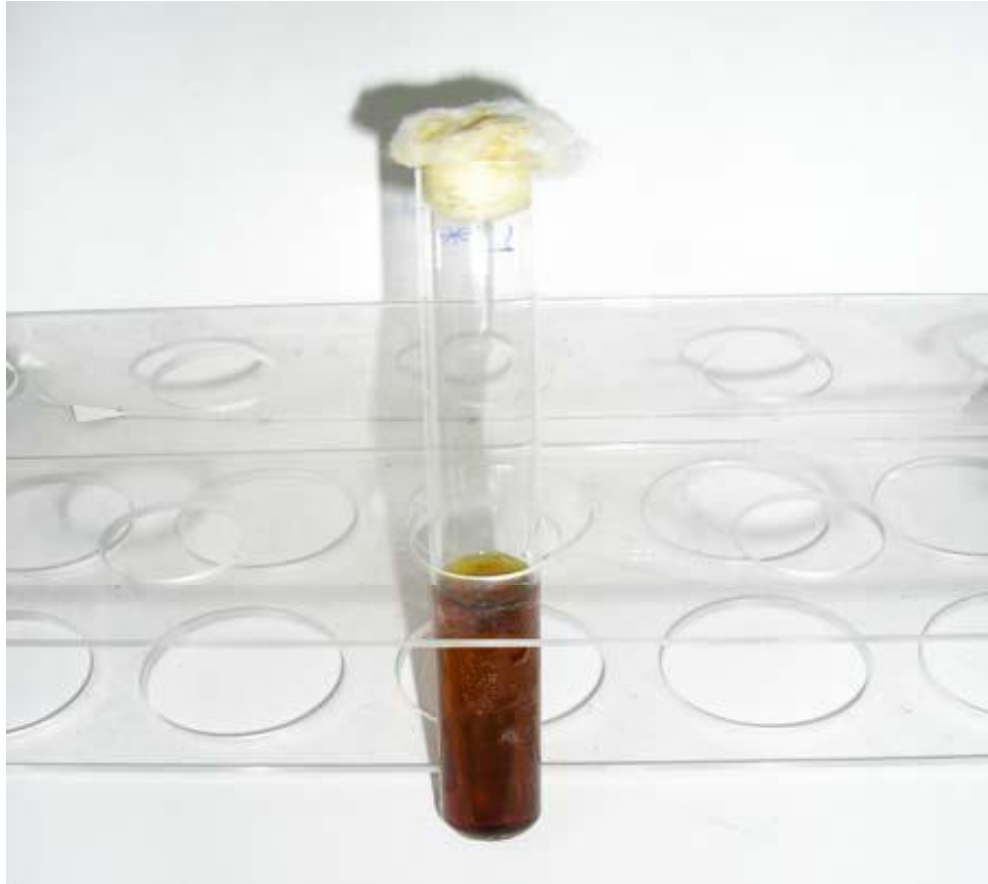
Ακολουθεί ανακαλλιέργεια 5 χαρακτηριστικών αποικιών σε αιματούχο άγαρ και αναερόβια επώαση αυτών στους 37°C για 72 ώρες.

Τέλος ακολουθούν οι εξής επιβεβαιωτικές δοκιμασίες:

- Έλεγχος αερόβιας και αναερόβιας ανάπτυξης.
- Έλεγχος κινητικότητας (Motility-nitrate medium).
- Ζύμωση λακτόζης (Lactose gelatin medium).
- Έλεγχος αντίδρασης Nagler (παραγωγή α-τοξίνης).



**Εικ3. Αποικίες του *C. perfringens* σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει υγρό εκλεκτικό υπόστρωμα L.S broth.**



**Εικ4. Αποικίες του *C. perfringens* σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει υγρό εκλεκτικό υπόστρωμα L.S broth.**



**Εικ5. Μη ύπαρξη αποικιών του *C. perfringens* σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει υγρό εκλεκτικό υπόστρωμα L.S broth.**

## **2.4. Υποστρώματα**

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των παθογόνων βακτηρίων *C. perfringens* και *Clostridium spp* είναι τα παρακάτω:

### **1. Medium Lactose – Sulfite: L.S (Y.9)**

Tryptic digest of casein	5 g
Yeast extract (Difco)	2,5 g
Sodium chloride	2,5 g
Lactose	10 g
L- cysteine hydrochloride	0,3g
D.W.	1000,0ml
pH 7,1 +- 0,1	

Παρασκευή: Τα υλικά του υποστρώματος L.S. διαλύονται με βρασμό, ρυθμίζεται το pH, κατανέμεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες ανά 9 ml.

Τοποθετείται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα ανεστραμμένο σωληνάριο Durham.

Αποστειρώνεται στους 115°C/20 λεπτά.

Πριν τη χρήση του υποστρώματος L.S., πραγματοποιείται βρασμός στους 100° C/20 λεπτά για να μειωθεί το διαλυτό O<sub>2</sub> που περιέχεται στο υπόστρωμα κάθε δοκιμαστικού σωλήνα. Ακολουθεί ψύξη των σωλήνων με κρύο νερό. Λίγο πριν την τοποθέτηση των υπό εξέταση δειγμάτων στους σωλήνες τοποθετείται σε αυτούς 0,5 ml από διάλυμα 1,2% anhydrous sodium metabisulphite (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και 0,5 ml από διάλυμα 1% ferric ammonium citrate.

Τα δύο παραπάνω διαλύματα έχουν προετοιμασθεί, φιλτραρισθεί (με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm) και αποστειρωθεί λίγο πριν την τοποθέτησή τους στους δοκιμαστικούς σωλήνες.



## **2. Brain heart infusion Broth (BHI Broth) (Y.6)**

Χρησιμοποιείται έτοιμο του εμπορίου και ακολουθούνται οι οδηγίες του παρασκευαστή οίκου.

Ρυθμίζεται το pH, (pH: 7,4), κατανέμεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστειρώνεται στους 121°C/15 λεπτά.

## **3. Blood Agar (Y.10)**

pH: 7,2 ± 0,2

A. Beef Extract	10g
Peptone	10g
Sodium Chloride	5g
Agar	15g
D.W.	950ml

**B.** Στείρο απινιδωμένο αίμα: Συλλέγεται με άσηπτες συνθήκες αίμα μέσα σε μια αποστειρωμένη κωνική φιάλη με εσφυρισμένα τα τοιχώματα του λαιμού και πώμα, η οποία περιέχει γυάλινα σφαιρίδια. Η φιάλη αναταράσσεται δυνατά για να καταστραφούν τα πλέγματα ινικής του αίματος.

Παρασκευή: Τα συστατικά του υποστρώματος Α διαλύονται με βρασμό, ρυθμίζεται το pH, κατανέμεται σε φιάλες σε καθορισμένους όγκους και αποστειρώνεται στους 121°C για 15 min. Μετά την αποστείρωση, όταν η θερμοκρασία του υποστρώματος είναι 45-50°C προσθέτονται ασήπτως 50 ml απινιδωμένο αίμα σε 950 ml βασικού υποστρώματος. Το υπόστρωμα κατανέμεται σε τρυβλία petri ανά 15-20 ml τα οποία μετά τη στερεοποίησή τους υποβάλλονται υποχρεωτικά σε 24ωρη δοκιμαστική επώαση για έλεγχο στειρότητας.

Σημείωση: Η αιμόλυση μπορεί να γίνει σαφέστερα αντιληπτή εάν ο πυθμένας των τρυβλίων καλυφθεί με λεπτό στρώμα θρεπτικού άγαρ προτού κατανεμηθεί το αιματούχο άγαρ.



#### **4. Triple Sugar Iron Agar ή TSI Agar (Y.5)**

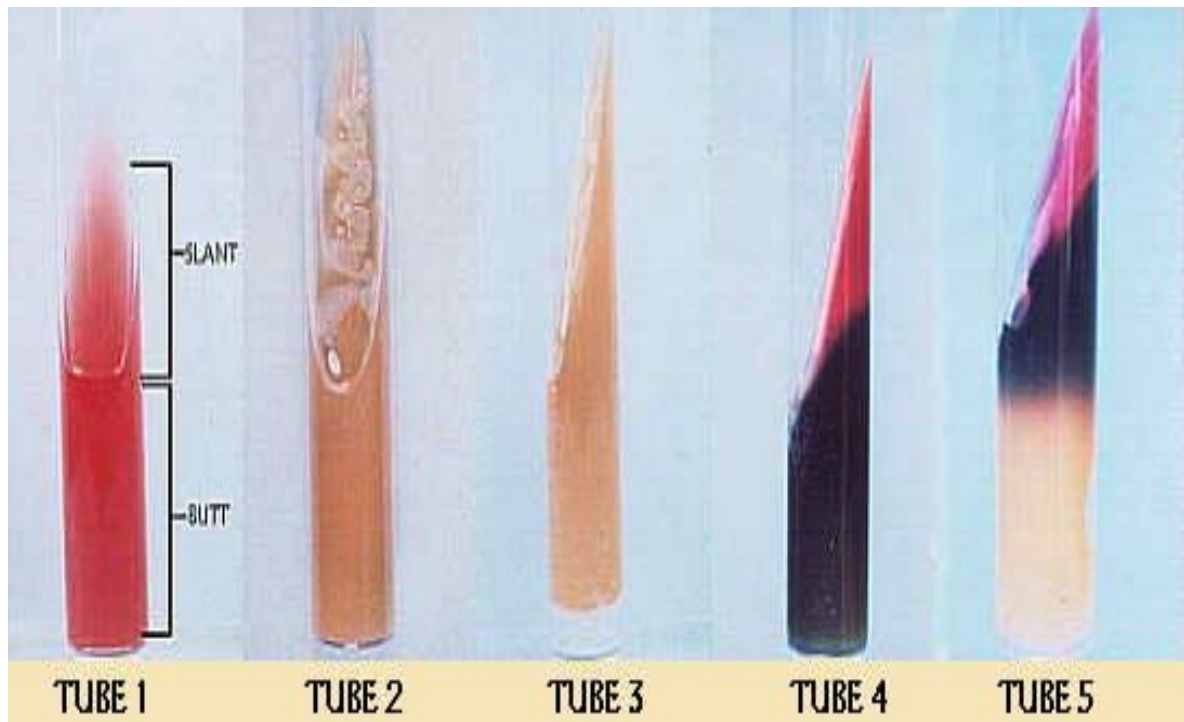
Yeast Extract	3g
Beef Extract	3g
Peptone	15g
Proteose Peptone	5g
Glucose	1g
Lactose	10g
Sucrose	10g
Ferrous Sulfate	0,2g
Sodium Chloride	5g
Sodium Thiosulfate	0,3g
Phenol Red	0,024g
Agar	12g
D.W. q.s.	1000ml

Παρασκευή: Τα συστατικά του υποστρώματος διαλύονται με βρασμό, ρυθμίζεται το pH ( $\text{pH}=7,3 \pm 0,1$ ), κατανέμεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες σε ύψος ενός τρίτου, αποστειρώνεται στους  $121^{\circ}\text{C}$  για 12 min και στερεοποιείται σε κεκλιμένη κατά 2/3 θέση (2,5 cm βυθός και 5 cm κεκλιμένη επιφάνεια).

Χρήση: Δοκιμή παραγωγής  $H_2S$  σε συνδυασμό με ζύμωση λακτόζης, γλυκόζης και σακχαρόζης.

Το αγαρ αυτό είναι ένα διαφορικό μέσο, το μέσο αυτό μετράει την ικανότητα των βακτηριδίων να αξιοποιούν τρία σάκχαρα, την γλυκόζη, την σουκροζη και την λακτόζη, οι συγκεντρώσεις των οποίων είναι 0,1%, 1% και 1% αντίστοιχα. Ο δείκτης που υπάρχει στο υπόστρωμα, μπορεί να εντοπίσει την παραγωγή οξέος από την ζύμωση των υδατανθράκων και θα αλλάξει το χρώμα του υποστρώματος ως αποτέλεσμα της ζύμωσης, όπου η αλλαγή του χρώματος στους σωλήνες θα αναφέρει ότι τα σάκχαρα έχουν υποστεί ζύμωση. Η παρουσία μαύρου χρώματος δείχνει ότι έχει παραχθεί υδρόθειο ( $H_2S$ ). Στο υπόστρωμα το υδρόθειο αντιδρά με το θειικό άλας σιδήρου και το μετατραπεί σε μαύρο χρώμα.

Το κίτρινο χρώμα υποδηλώνει αλλαγή οξέος στο υπόστρωμα, ενώ οι μη μεταβολή του χρώματος σχετίζεται με αλκαλικό περιβάλλον. Ο ενοφθαλμισμός του σωλήνα είναι μια διαδικασία δυο βημάτων. Στο πρώτο βήμα, ένας βρόχος από βακτήρια είναι κατανεμημένος σε όλη την επιφάνεια του αγαρ. Και στο δεύτερο βήμα, μια βελόνα με βακτήρια εισάγεται στο κάτω μέρος του σωλήνα. Οι υδατάνθρακες που χρησιμοποιούνται μπορούν και προσδιορίζονται μέσω της ανάλυσης του βαθμού του οξέος που παράγεται. Η παραγωγή οξέος περιορίζεται μόνο στον πυθμένα του σωλήνα ως ενδεικτικό ζύμωσης της γλυκόζης. Αυτό οφείλεται λόγω της χαμηλότερης συγκέντρωσης της γλυκόζης από τα άλλα σάκχαρα και έτσι η παραγωγή οξέος δεν είναι πολύ εμφανής. Η παραγωγή οξέος στην κορυφή της κλίσης και στον πυθμένα προκαλείται από την ζύμωση της σουκροζης και της λακτόζης, εξαιτίας των σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων αυτών των σακχάρων. Το TSI αγαρ μπορεί επίσης να ανιχνεύσει την μετατροπή θειικού νατρίου σε θειικό υδρόθειο. Η παραγωγή άλλων αερίων χαρακτηρίζεται από ρωγμές στο αγαρ, καθώς και σχηματισμού αέρα στο κάτω μέρος του δοκιμαστικού σωλήνα.



### Ερμηνεία των παραπάνω σωλήνων

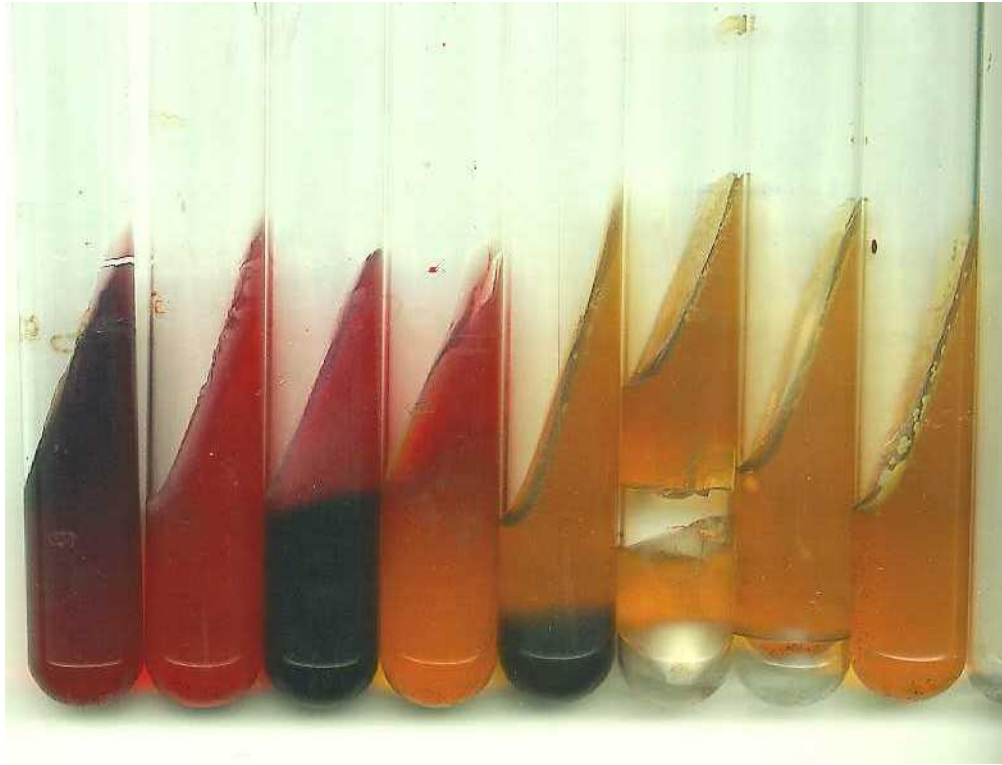
	1 σωλήνας (μη ενοφθαλμισμένος)	2 σωλήνας	3 σωλήνας	4 σωλήνας	5 σωλήνας
<b>Επικλινής</b>	--	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>K</b>	<b>K</b>
<b>Πυθμένος</b>	--	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>Θειικό υδρόθειο</b>	--	--	--	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Αέριο</b>	--	--	<b>+</b>	--	--
<b>A= όξινο K= Αλκαλικές</b>					

**Εικ6.** Ερμηνεία των παραπάνω σωλήνων.

<u>Επικλινή χρώμα:</u>	<u>Ερμηνεία:</u>
RED (κόκκινο)	Δεν γίνεται βρασμός λακτόζης και σουκροζης.
Κίτρινο	Ζύμωση λακτόζης η και σουκροζης.

<u>Χρώμα στον πυθμένα:</u>	<u>Ερμηνεία:</u>
Κόκκινο	Δεν γίνεται ζύμωση της λακτόζης.
Κίτρινο	Μερική ζύμωση της γλυκόζης παρατηρείται, έχει παραχθει οξύ.
Παραγωγή αερίου	Παρατηρούνται ρωγμές στο αγαρ, φυσαλίδες η όλο το βάρος μπορεί να βρεθούν εκτός του σωλήνα. (προσοχή!! Αερώδης ζύμωση μπορεί να εμφανιστεί στα βακτήρια κοντά στο άνοιγμα.)
Μαύρο	Παράγεται H <sub>2</sub> S.

Πίνακας 5. Ερμηνεία σωλήνων.



Εικ7. Triple Sugar Iron agar(TSI).

Από αριστερά προς τα δεξιά:

A. Μη ενοφθαλισμένος.

B. Κόκκινος πυθμένας και κόκκινη κορυφή, κανένα μαύρο χρώμα= καμιά ζύμωση γλυκόζης, σουκροζης η λακτόζης. Δεν παράγεται υδρόθειο.

Γ. Κόκκινη κορυφή και μαύρος πυθμένας, καμιά ζύμωση λακτόζης η σουκροζης. Παραγωγή υδρόθειου.

Δ. Κόκκινη κορυφή, κίτρινος πυθμένας= ζύμωση λακτόζης η σουκροζης. Παραγωγή υδρόθειου.

Ε .Κιτρίνη κορυφή, κίτρινος πυθμένας και μαύρος χρωματισμός= ζύμωση λακτόζης, σουκροζης και γλυκόζης. Παραγωγή υδρόθειου.

ΣΤ .Κιτρίνη στάμπα, κίτρινος πυθμένας και ανύψωση η και τεμαχισμός του υποστρώματος, όχι μαύρος χρωματισμός= ζύμωση λακτόζης, σουκροζης και γλυκόζης. Δεν παράγεται υδρόθειο αλλά παράγεται αέριο.

Z. Κιτρίνη στάμπα, κίτρινος πυθμένας και όχι ανύψωση η και τεμαχισμός υποστρώματος, όχι μαύρος χρωματισμός= ζύμωση λακτόζης, σουκροζης και γλυκόζης. Δεν παράγεται αέριο.

### **5. Πεπτονούχο νερό (Buffered peptone dilution water) (Y.1)**

Peptone	1,0g
DW g.s	1000,0 ml
Ph: 7 +- 0,1	

Παρασκευή: Διαλύεται η πεπτόνη με ήπια θέρμανση, ρυθμίζεται το pH με 1N διάλυμα NaOH, κατανέμεται σε φιάλες και αποστειρώνεται στους 121°C/15 λεπτά.

## **6. Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar (Y.4)**

pH= 7,4 ± 0,2

Yeast extract	3 g
L-lysine	5 g
Xylose	3.75 g
Lactose	7.5 g
Sucrose	7.5 g
Sodium desoxycholate	2.5 g
Ferric ammonium citrate	0.8 g
Sodium thiosulfate	6.8 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Phenol red	0.08 g
Distilled water	1000ml

Παρασκευή: Θέρμανση με αναταραχή ακριβώς μέχρι το μέσο να βράσει. Δεν πρέπει να γίνει υπερθέρμανση. Τοποθετείται το μέσο σε τρυβλία petri στους 50°C. Αφήνεται να στερεοποιηθεί για περίπου 2 h. Δεν αποθηκεύεται για περισσότερο από 1 ημέρα.

## **7. Rappaport-Vassiliadis Medium (Y.2)**

Βάση ζυμού:

Tryptone	5g
NaCl	8g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,6g
Distilled water	1000ml

Magnesium chloride solution :

MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	400g
Distilled water	1000ml

Malachite green oxalate solution :

Malachite green oxalate	0,4g
Distilled water	100ml



Για να προετοιμαστεί το μέσο συνδυάζονται 1000ml βάση ζωμού, 100 ml διάλυμα magnesium chloride, και 10 ml διάλυμα malachite green oxalate. Η βάση ζωμού πρέπει να προετοιμαστεί την ίδια ημέρα που τα συστατικά συνδυάζονται για να γίνει το πλήρες μέσο. Η λύση χλωριδίου του μαγνησίου μπορεί να αποθηκευτεί σε σκοτεινό μπουκάλι, σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι 1 έτος. Για να προετοιμαστεί η λύση, διαλύεται ολόκληρο το περιεχόμενο του  $MgCl_2 \cdot H_2O$  από πρόσφατα ανοιγμένο δοχείο σύμφωνα με τον τύπο, επειδή αυτό το άλας είναι πολύ υγροσκοπικό. Η λύση του Malachite green oxalate μπορεί να αποθηκευτεί σε σκοτεινό μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι και 6 μήνες. Καθαρό Malachite green oxalate της εταιρείας Merck συστήνεται επειδή άλλες εμπορικές μάρκες μπορεί να μην είναι εξίσου αποτελεσματικές. Διανέμονται όγκοι των 10 ml του πλήρους μέσου σε σωλήνες δοκιμής 16 X 150 mm. Στη συνέχεια ακολουθεί αποστείρωση στους  $115^{\circ}C$  για 15 min. Διατηρείται στο ψυγείο και πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα σε χρονικό διάστημα 1 μήνα. Αυτό το μέσο πρέπει να γίνει από τα μεμονωμένα συστατικά του. Η χρήση των εμπορικά διαθέσιμων αφυδατωμένων μέσων δεν συστήνεται. Οι χρήστες αυτού του μέσου πρέπει να γνωρίζουν ότι υπάρχουν διατυπώσεις και θερμοκρασίες επώασης για αυτό εκτός από εκείνες που συστήνονται σε αυτό το εγχειρίδιο.

## **2.5. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ**

Έχουμε 11 δοκιμές. Την δοκιμή της κινητικότητας, την δοκιμή της ινδολης, την δοκιμή του ερυθρού μεθυλίου, δοκιμή Vogues-Proskauer (ανίχνευση ακετοϊνης), δοκιμή των κιτρικών αλάτων, δοκιμή ανάπτυξης παρουσία κυανιούχου καλίου(KCN test), δοκιμή παραγωγής ουρεασης, δοκιμή παραγωγή υδρόθειου, δοκιμή (ONPG test), αντίδραση Nagler και η δοκιμή οξειδωσης.

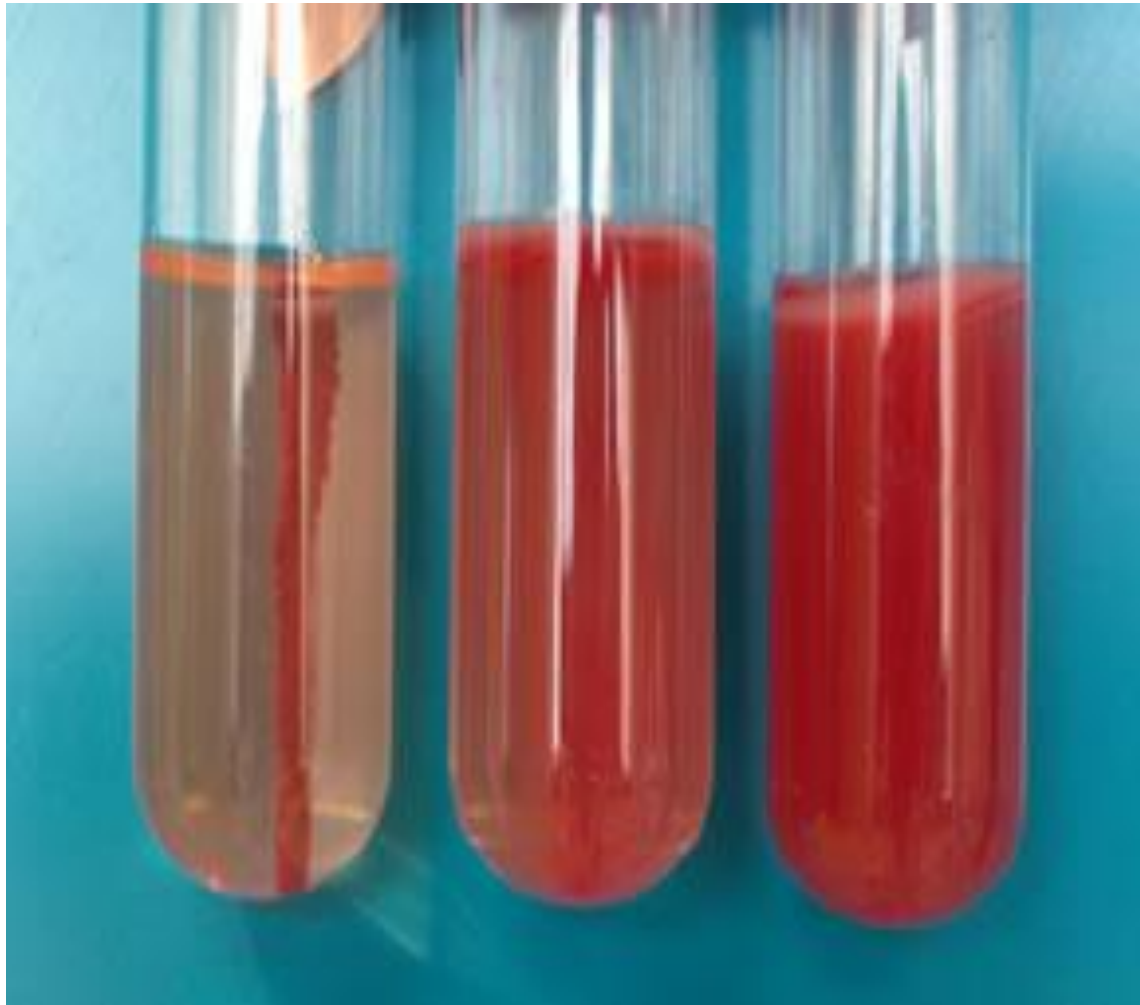
### **2.5.1. Δοκιμή κινητικότητας.**

Δοκιμαστικοί σωλήνες, οι όποιοι περιέχουν Motility Test Medium (B-59) ενοφθαλμίζονται με νύξη, σε βάθος 0,5 cm περίπου από την επιφάνεια τους. Οι καλλιέργειες επωάζονται είτε στην άριστη θερμοκρασία αναπτύξεως τού βακτηρίου που εξετάζεται, είτε σε χαμηλότερη (π.χ. 37°C η 22°C). Τα κινητά βακτήρια μεταναστεύουν σε όλο το υπόστρωμα και το καθιστούν θολερό, ενώ τα ακίνητα αναπτύσσονται μόνο επάνω στη γραμμή ενοφθαλμισμού. Ορισμένα στελέχη ακίνητων βακτηρίων είναι δυνατόν να παρουσιάσουν ανάπτυξη με μορφή προεκβολών από ένα η δυο σημεία της γραμμής ενοφθαλμισμού. Ο έλεγχος των καλλιεργειών και ή εκτίμηση τού αποτελέσματος πρέπει να γίνεται αμέσως μετά την 8η ώρα γιατί τα εντόνως κινητά βακτήρια διεισδύουν σε όλο το υπόστρωμα πριν από την 24η ώρα οπότε και ή εκτίμηση είναι, δυσχερής.

Σημείωση: Για την ενίσχυση της κινητικότητας τα στελέχη καλλιεργούνται περισσότερες από μία φορές σε υπόστρωμα κινητικότητας μέσα σε σωλήνες σχήματος U.



**Εικόνα 8.** Ο αριστερός σωλήνας έχει αρνητικό αποτέλεσμα ενώ ο δεξιός μας δίνει θετικό αποτέλεσμα λόγω της κίνησης του οργανισμού.



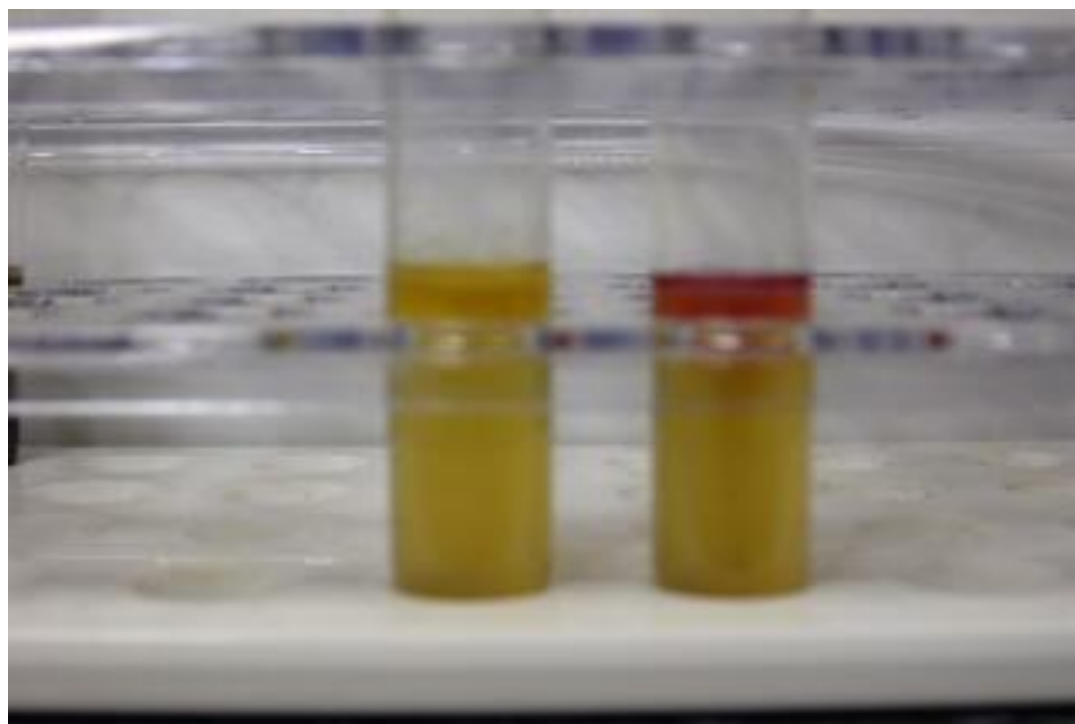
**Εικόνα 9.** Ο πρώτος σωλήνας μας δίνει αρνητικό αποτέλεσμα ενώ ο δεύτερος και ο τρίτος μας δίνουν θετικό αποτέλεσμα.

### **2.5.2 Δοκιμή της ινδολης (indole test).**

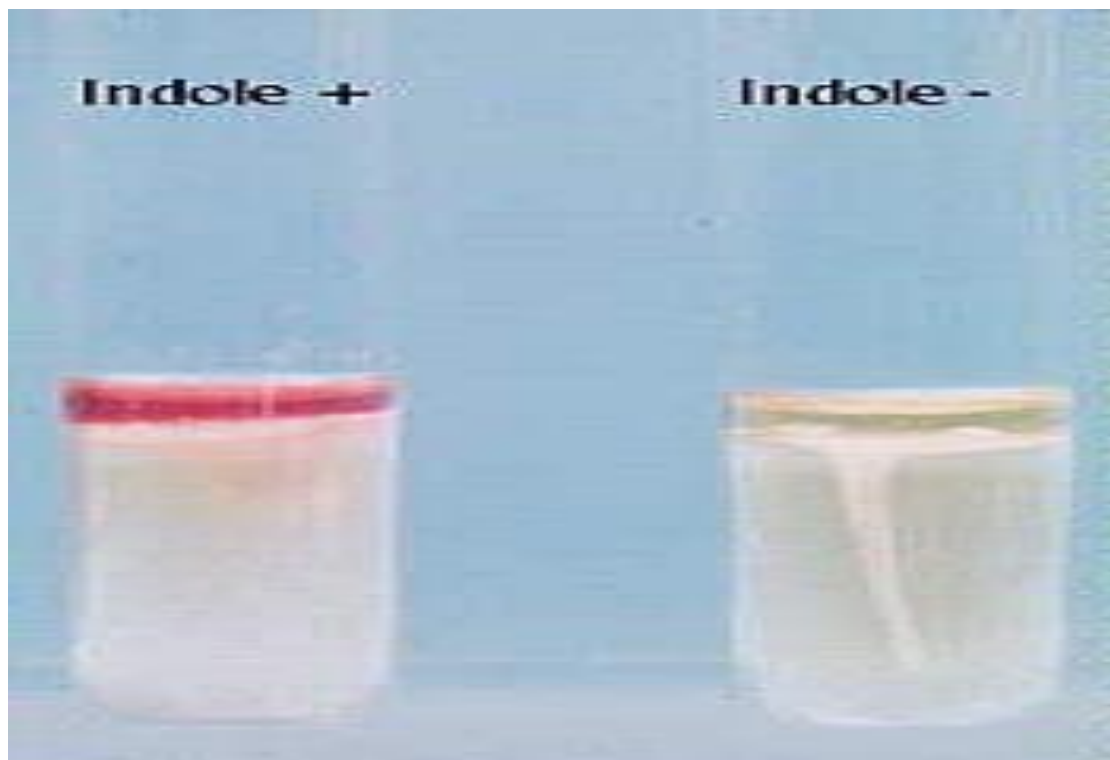
Με τη δοκιμή αυτή διερευνάται η ικανότητα ορισμένων βακτηρίων να αποδομούν το αμινοξύ τρυπτοφάνη προς ινδόλη. Η ινδόλη η οποία παράγεται ανιχνεύεται με τη βοήθεια της paradimethylaminobenzaldehyde με την οποία σχηματίζει έγχρωμη ένωση.

#### **Τεχνική**

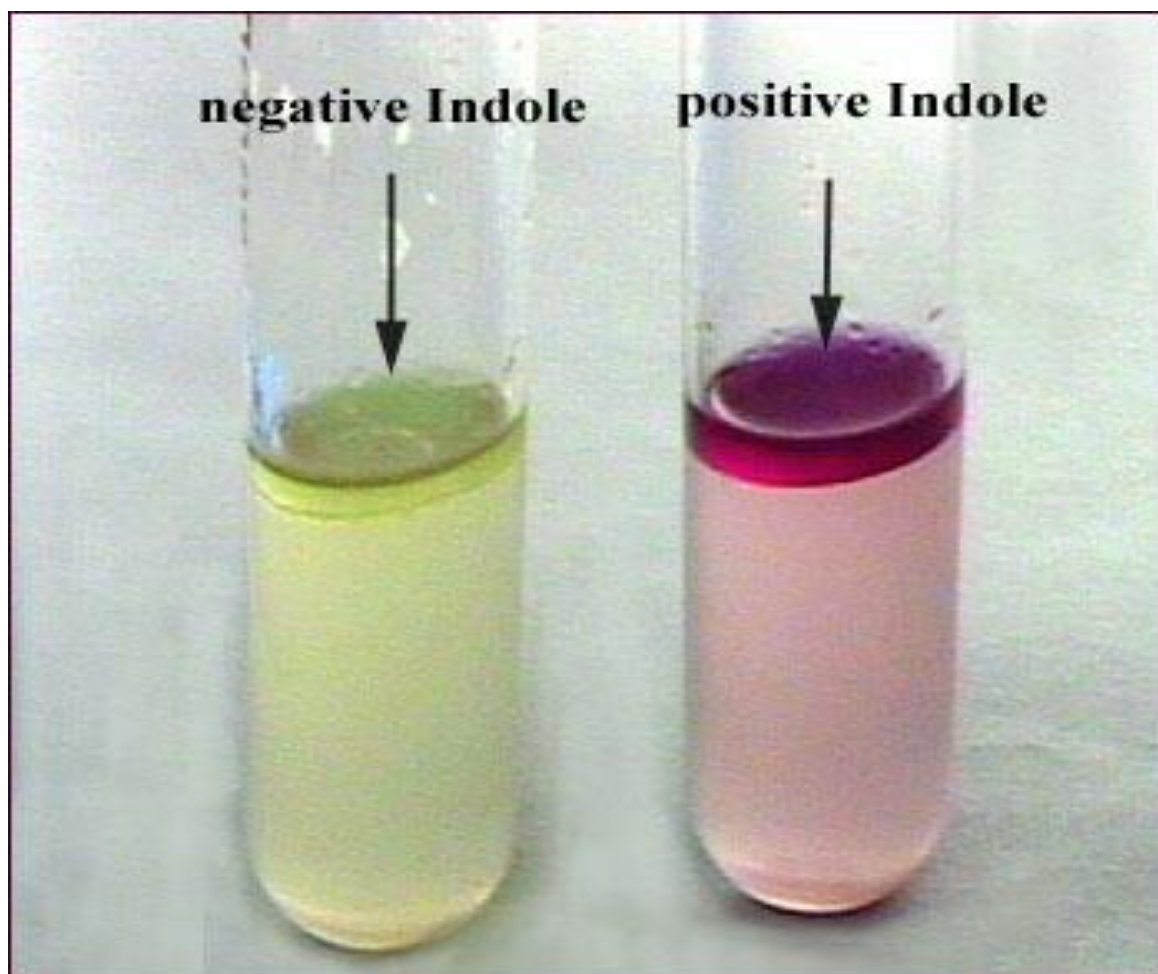
Ενοφθαλμίζονται σωλήνες με Peptone Water (CB-77) ή καλύτερα με Tryptone water (B-109), γιατί η πεπτόνη η οποία χρησιμοποιείται, πρέπει να είναι πλούσια σε τρυπτοφάνη και επωάζονται στους 37°C για 48 ώρες. Σε ορισμένες περιπτώσεις για να υπάρξει η απαιτούμενη συγκέντρωση ινδόλης στο υπόστρωμα, ο χρόνος επώασης επιμηκύνεται κατά 48 ακόμη ώρες. Προσθέτονται 0,2 ml αντιδραστηρίου Kovacs (A-8) σε 5 ml καλλιέργειας και το περιεχόμενο του σωλήνα αναδεύεται ελαφρά. Θετική θεωρείται η δοκιμή όταν η στιβάδα της αμυλικής αλκοόλης πάρει κόκκινο χρώμα.



**Εικόνα 10.** Ο αριστερός είναι αρνητικός και ο δεξιός θετικός (κόκκινος δακτύλιος).



**Εικόνα 11.** Ο πρώτος είναι θετικός (κοκκινός δακτυλιός) και ο δεύτερος αρνητικός.



**Εικόνα 12.** Δοκιμή ινδολης. Κόκκινος δακτύλιος αρά και θετικό αποτέλεσμα.



**Εικόνα 13.** Δοκιμή ινδολης σε αντιδραστήριο Kovacs.



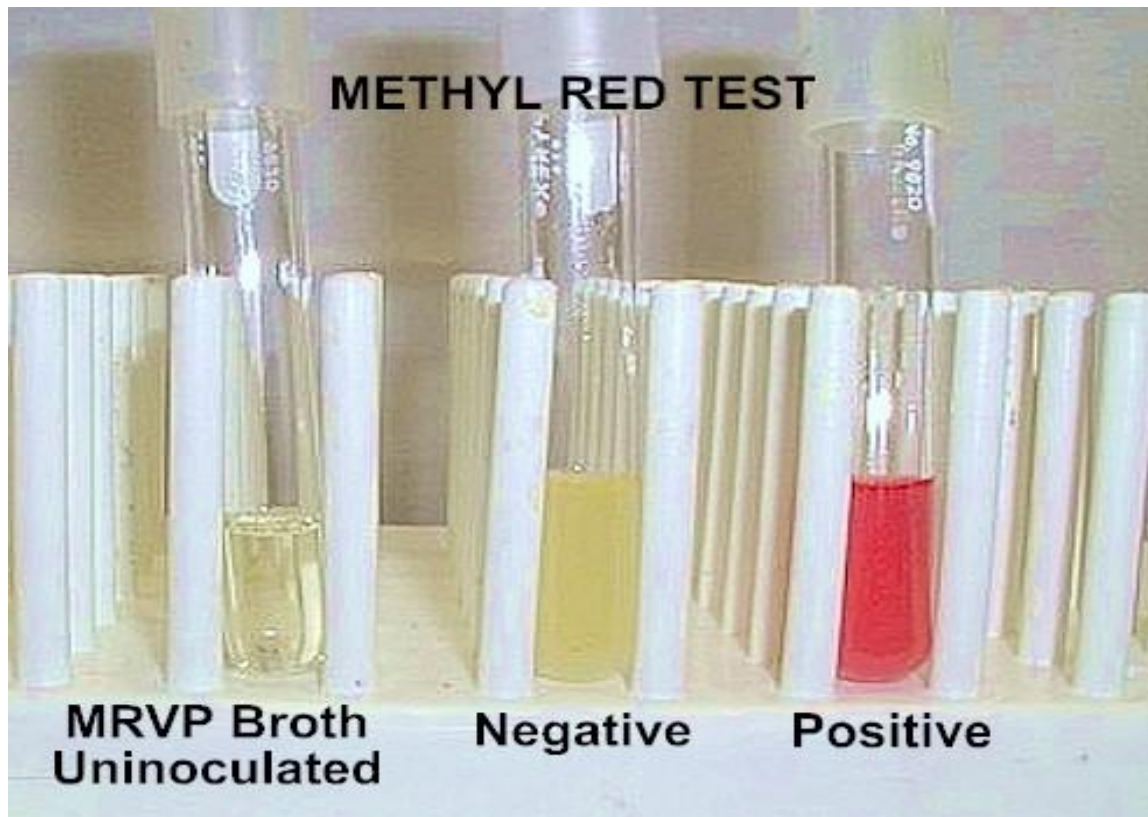
### **2.5.3. Δοκιμή του ερυθρού του μεθυλίου(methyl red test).**

Το ερυθρό του μεθυλίου στη δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται απλώς σαν δείκτης pH. Ορισμένα βακτήρια, όπως η *Escherichia coli*, παράγουν αρκετή ποσότητα οξέος από τη διάσπαση της γλυκόζης που περιέχεται στο υπόστρωμα, στο οποίο εκτελείται η δοκιμή, ώστε να προκαλείται αυτοανάσχεση. Άλλα βακτήρια όπως τα γένη *Klebsiella* και *Aerobacter* δεν παράγουν αρκετό οξύ για να αναστείλει την ανάπτυξη τους, όποτε εξακολουθούν να αναπτύσσονται και αποδομούν τις πεπτόνες οι οποίες περιέχονται στο υπόστρωμα. Συνέπεια του γεγονότος αυτού είναι η μεταβολή του pH του υποστρώματος προς το αλκαλικότερο. Με την προσθήκη σταγόνων ερυθρού του μεθυλίου διαπιστώνεται το pH της καλλιέργειας. Το ερυθρό του μεθυλίου είναι δείκτης που σε pH 4,2 παίρνει κόκκινο και σε pH 6,3 κίτρινο χρώμα.

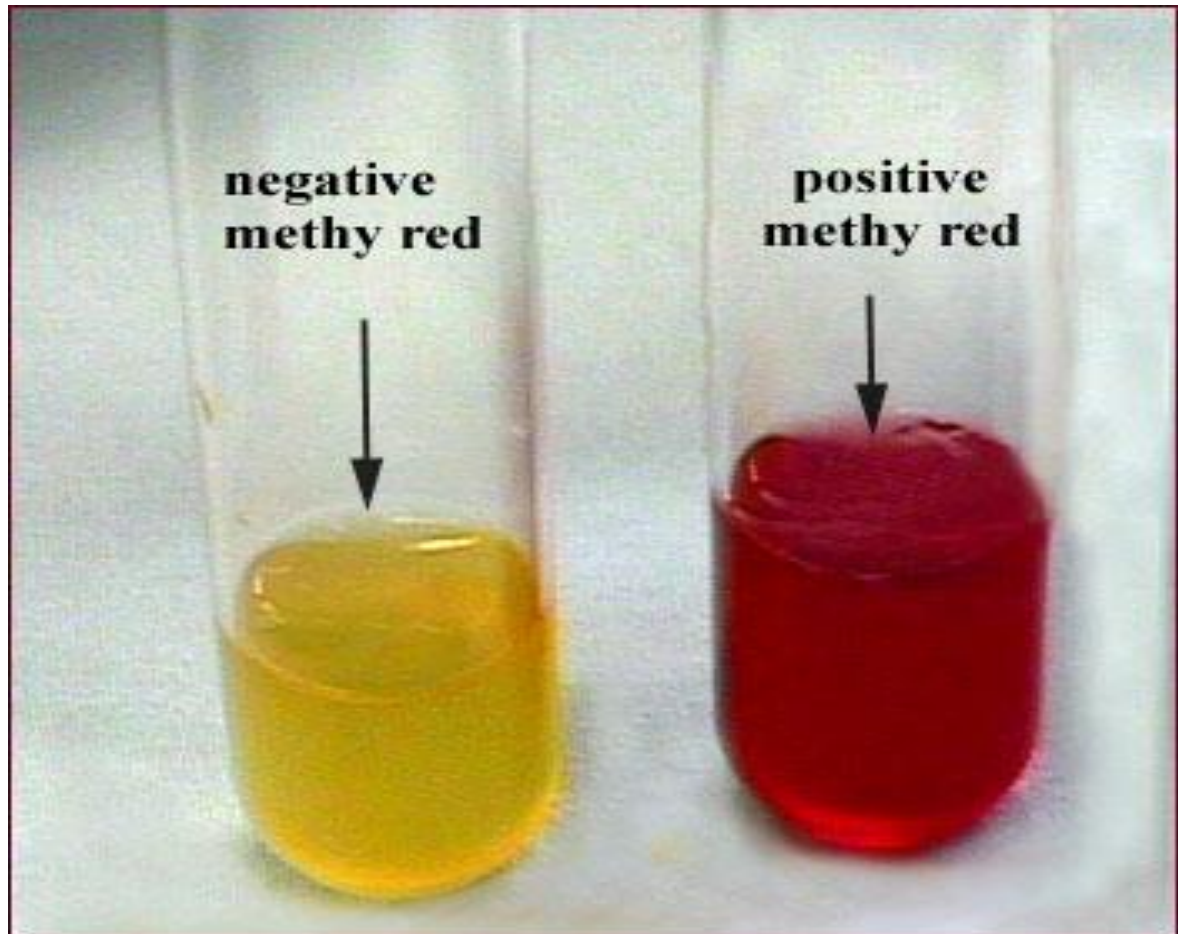
#### Τεχνική

Ενοφθαλμίζονται σωλήνες οι οποίοι περιέχουν Buffered Glucose Broth (B-13) και επωάζονται στους 37°C για 2 ημέρες ή στους 30°C για 5 ημέρες. Προσθέτονται 5 σταγόνες αντιδραστηρίου MR (A-11) ανά 5 ml καλλιέργειας, αναδεύεται το περιεχόμενο των σωλήνων και γίνεται αμέσως η ανάγνωση. Κόκκινο χρώμα σε όλη την έκταση του υποστρώματος σημαίνει θετική δοκιμή, πορτοκαλί αμφίβολη και κίτρινο αρνητική.

Στην ίδια καλλιέργεια είναι δυνατόν να γίνει στη συνέχεια η δοκιμή VP. Συνήθως όμως επειδή οι δοκιμές MR και VP γίνονται σε συνδυασμό, το στέλεχος που εξετάζεται αναπτύσσεται σε 6 ml υποστρώματος (B-13) οπότε 1 ml από την καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα διαστάσεων 13 x 100 mm όπου εκτελείται η δοκιμή VP και στην υπόλοιπη καλλιέργεια γίνεται η δοκιμή MR.



**Εικόνα 14.** Ο πρώτος σωλήνας είναι μη ενοφθαλισμένος. Ο μεσαίος μας δίνει αρνητικό αποτέλεσμα. Και ο δεξιός σωλήνας μας δίνει θετικό αποτέλεσμα.



**Εικόνα 15.** Δοκιμή Methyl Red. Κόκκινος χρωματισμός άρα θετικό αποτέλεσμα.

#### **2.5.4. Δοκιμή Vogues-Proskauer η VP ( ανίχνευση ακετοΐνης).**

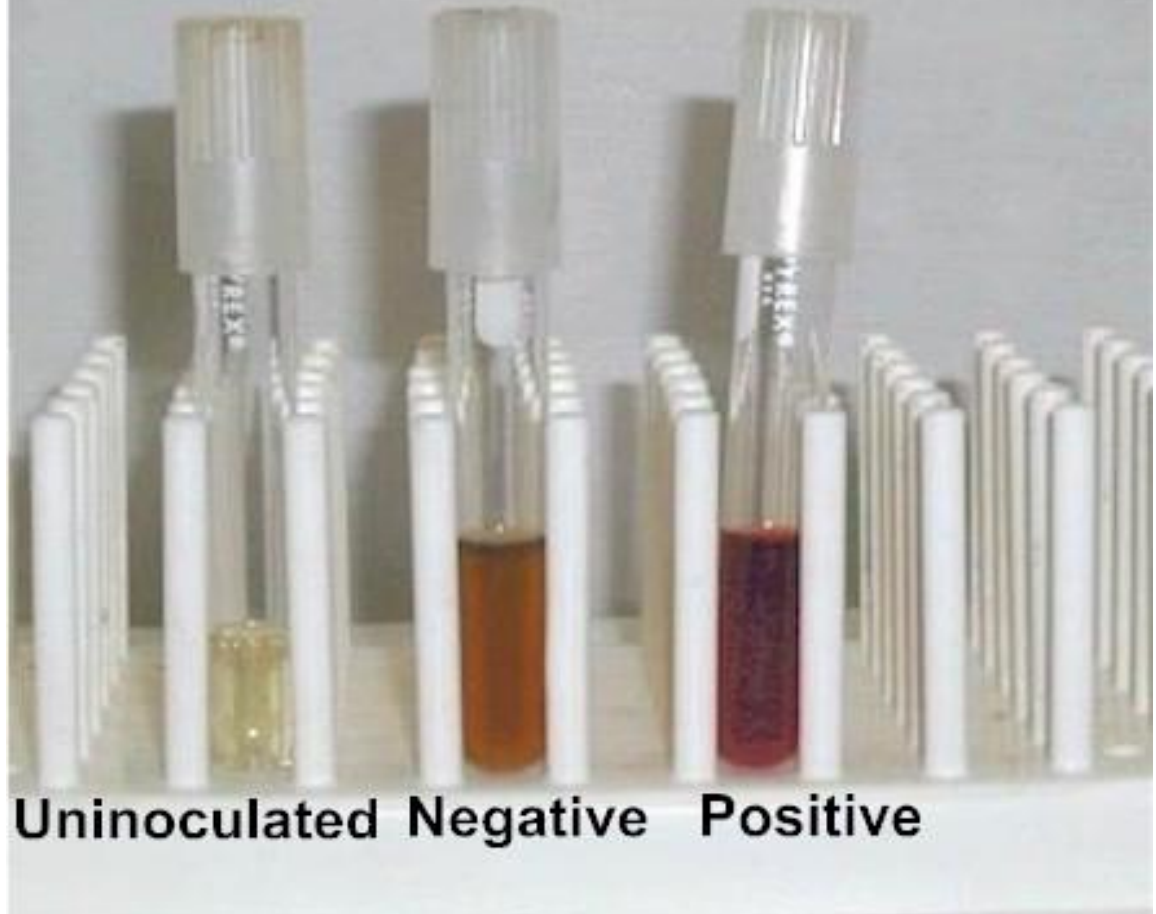
Πολλά βακτήρια σχηματίζουν από τη γλυκόζη (ή ορθότερα από το πυροσταφυλικό οξύ, στο οποίο καταλήγει η ζύμωση των υδατανθράκων), ακετυλομεθυλοκαρβινόλη (ακετοΐνη). Η ακετοΐνη ή το παράγωγό της 2,3 βουτυλενογλυκόλη κατά τη στιγμή της αντιδράσεως, παρουσία αλκάλειως οξειδώνεται προς διακετύλιο, το οποίο σε αλκαλικές συνθήκες αντιδρά με αργινίνη ή κρεατίνη και δίνει έγχρωμη ένωση (Cruickshank και συν., 1975). Η δοκιμή γίνεται σε συνδυασμό με τη δοκιμή MR (14.4).

#### Τεχνική

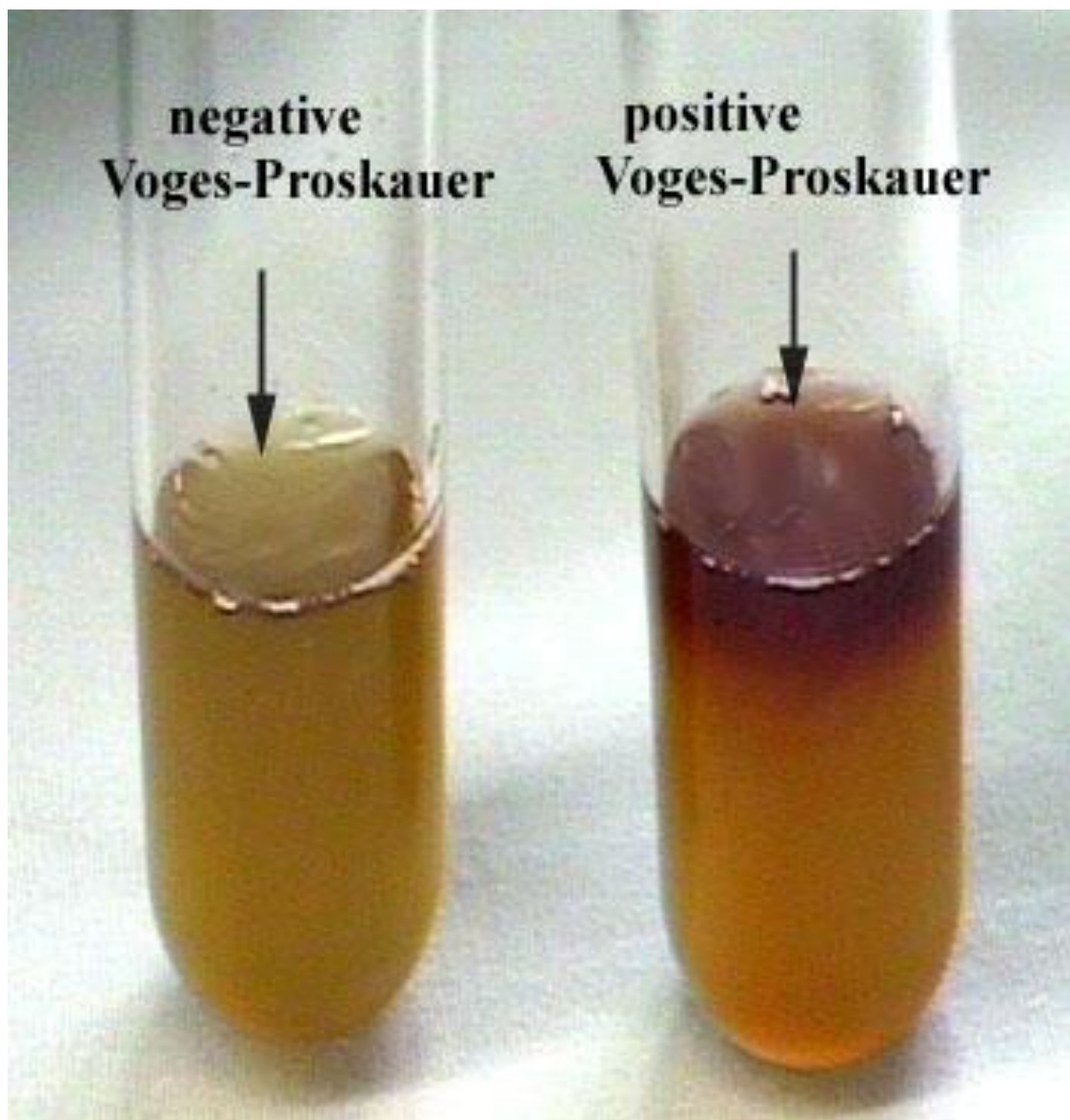
α) Μέθοδος Barritt (1936): Από τις καλλιέργειες της δοκιμής 14.4 μεταφέρεται 1 ml καλλιέργειας σε καθαρό σωλήνα 13x100 mm. Προσθέτονται 0,2 ml 40% διαλύματος KOH, γίνεται ανάμιξη και προσθέτονται 0,6 ml αντιδραστηρίου α-naphthol (A-4). Γίνεται ανάμιξη και ο σωλήνας τοποθετείται σε κεκλιμένη θέση ώστε να ευνοηθεί η οξείδωση. Παρατηρείται κάθε 15 min επί 1 ώρα. Θετική είναι η δοκιμή όταν το υγρό του σωλήνα πάρει έντονο κόκκινο (ρουμπινί) χρώμα. Χρώμα χαλκόχρουν ή καφέ ερμηνεύεται σαν αρνητική δοκιμή.

β) Μέθοδος O' Meara (1931): Σε 1 ml καλλιέργειας που προετοιμάστηκε όπως στο 14.4 προσθέτονται 2 σταγόνες αντιδραστηρίου κρεατίνης (A-6) και 1 ml 40% υδατικού διαλύματος KOH. Γίνεται καλή ανάμιξη και εξέταση μετά από 1 και 4 ώρες. Η αντίδραση είναι θετική όταν αναπτυχθεί ανοικτό κόκκινο χρώμα (eosin - pink).

## VOGES PROSKAUER TEST



**Εικόνα 16.** Ο πρώτος σωλήνας είναι μη ενοφθαλισμένος. Ο μεσαίος μας δίνει αρνητικό αποτέλεσμα. Και ο δεξιός μας δίνει θετικό αποτέλεσμα.



**Εικόνα 17.** Δοκιμή VP ( Vogues Proskauer ) δοκιμή.

### **2.5.5. Δοκιμή κιτρικών αλάτων.**

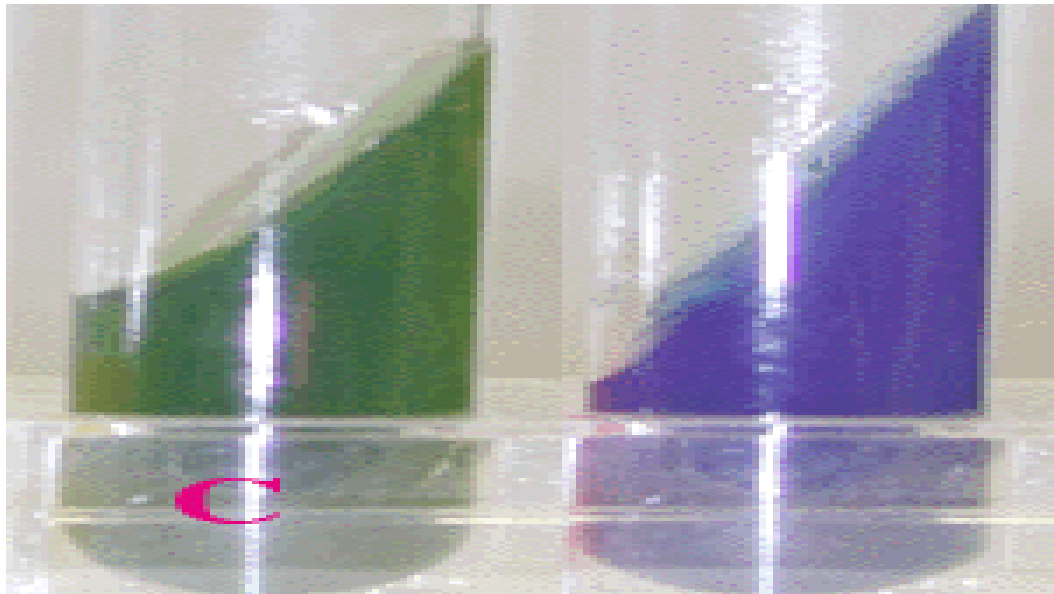
Με τη δοκιμή αυτή διερευνάται η ικανότητα των βακτηρίων να αξιοποιούν τα κιτρικά άλατα σαν μόνη πηγή άνθρακα και τα άλατα του αμμωνίου σαν μόνη πηγή αζώτου. Η δοκιμή είναι δυνατό να γίνει, με δύο μεθόδους :

Μέθοδος 1η: Ενοφθαλμίζονται σωλήνες με Koser's Citrate Medium (B-40α) με εναιώρημα του βακτηρίου που εξετάζεται, σε φυσιολογικό ορό και επωάζονται στους 30°C για 7 ημέρες όταν πρόκειται για εντεροβακτηριοειδή, ή στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης για τα υπόλοιπα βακτήρια και επί 4 ημέρες.

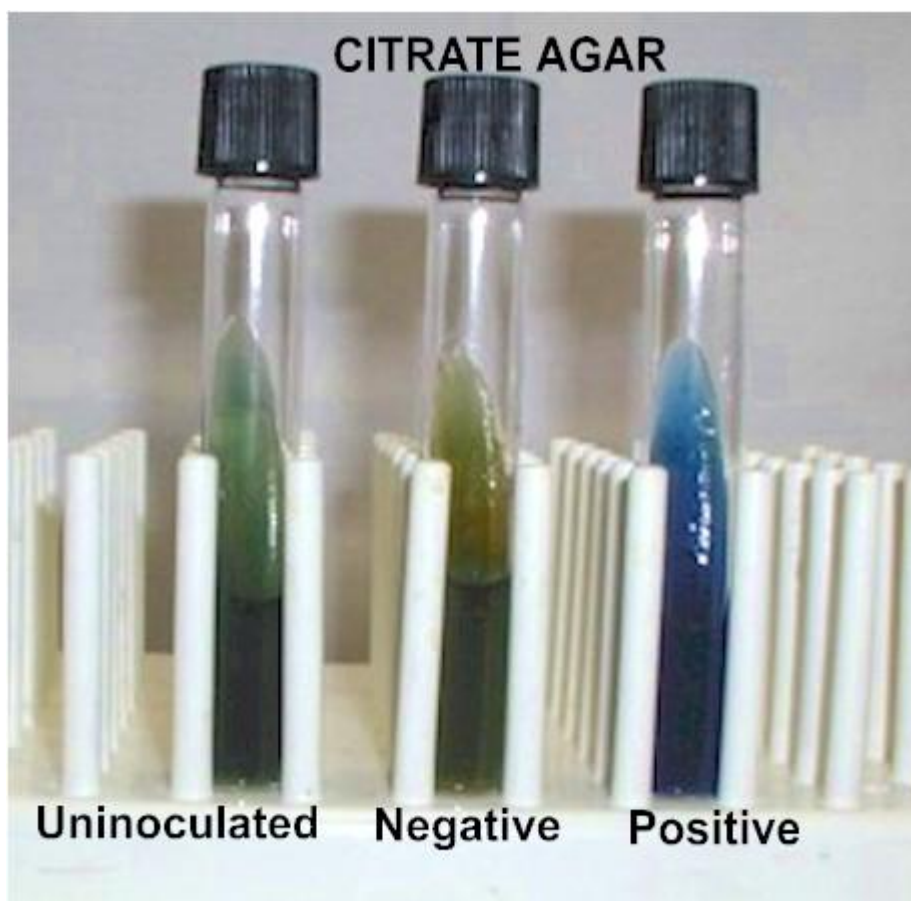
Θετική θεωρείται η δοκιμή όταν μετά την επώαση παρατηρείται θολερότητα (ανάπτυξη) στο υπόστρωμα. Αρνητική όταν δεν παρατηρείται θολερότητα. Από τους θετικούς σωλήνες γίνεται ενοφθαλμισμός είτε σε σωλήνες οι οποίοι περιέχουν το ίδιο υπόστρωμα, είτε σε σωλήνες με Simmon's Citrate Medium (B-93). Η δεύτερη δίοδος εξασφαλίζει, από λάθος θετικές αντιδράσεις, οι οποίες είναι δυνατόν να οφείλονται στο μέγεθος του ενοφθαλμίσματος.

Μέθοδος 2η: Ενοφθαλμίζεται η κεκλιμένη επιφάνεια Simmon's Citrate Agar (B- 93) με εναιώρημα βακτηρίων σε φυσιολογικό ορό. Οι σωλήνες επωάζονται στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου και εξετάζονται καθημερινά για 7 ημέρες.

Θετική θεωρείται η δοκιμή όταν παρατηρείται αλλαγή χρώματος του υποστρώματος από πράσινο σε σκούρο κυανό. Αρνητικά όταν δεν παρατηρείται αλλαγή χρώματος. Ορισμένοι συγγραφείς συνιστούν επιβεβαίωση των θετικών σωλήνων με δεύτερη δίοδο στο ίδιο υπόστρωμα.

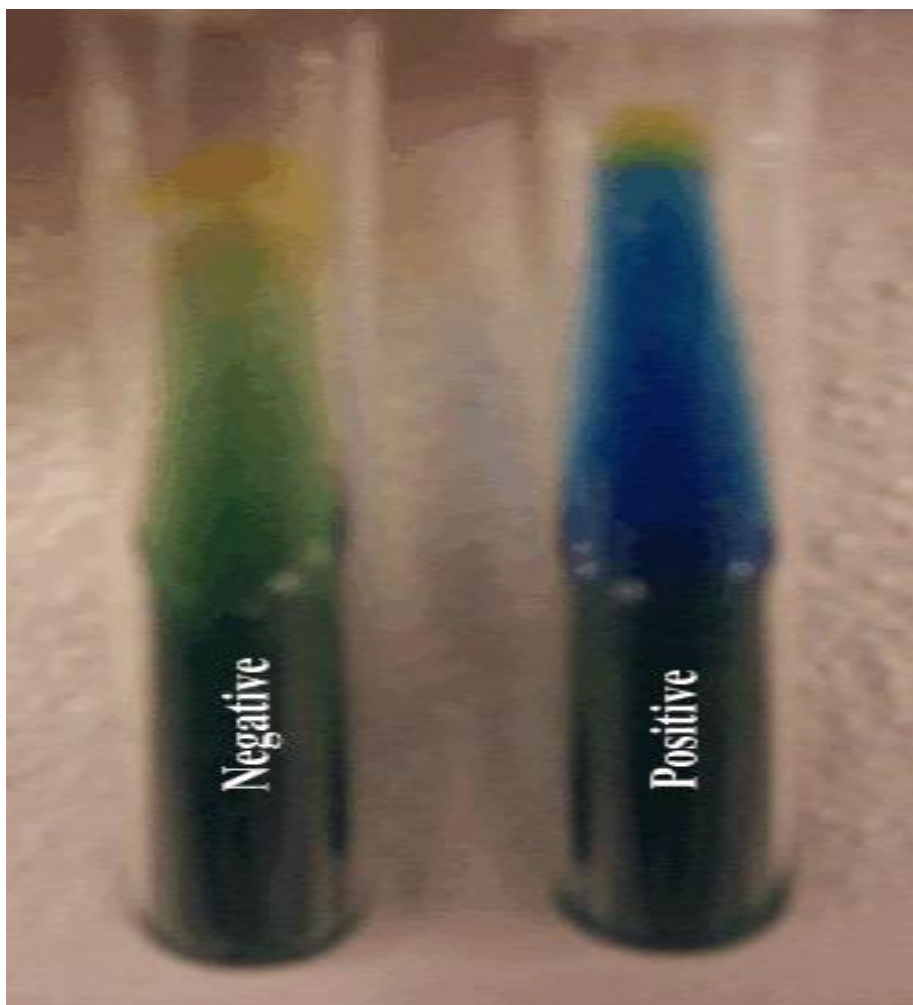


**Εικόνα 18.** Ο αριστερός σωλήνας είναι αρνητικός και ο δεξιός δίνει θετικό αποτέλεσμα.

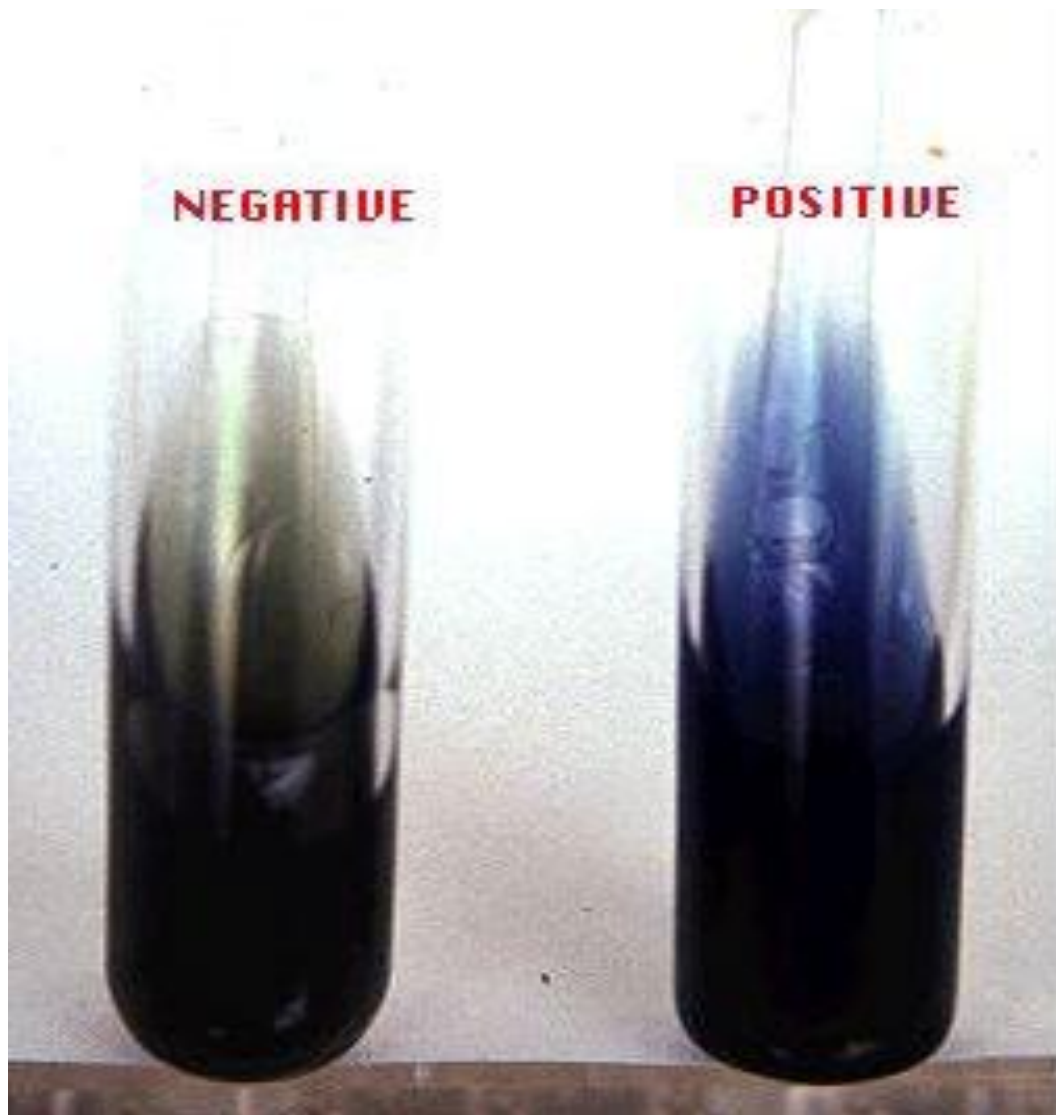


**Εικόνα 19.** Ο πρώτος σωλήνας είναι μη ενοφθαλμισμένος. Ο μεσαίος αρνητικός και ο τελευταίος είναι θετικός.





**Εικόνα 20.** Δοκιμή κιτρικών αλάτων. Ο αριστερός σωλήνας μας δίνει αρνητικό αποτέλεσμα και ο δεξιός μας δίνει θετικό αποτέλεσμα.



**Εικόνα 21.** Ο αριστερός σωλήνας είναι αρνητικός ενώ ο δεξιός είναι θετικός.

### **2.5.6. Δοκιμή ανάπτυξης παρουσία κυανιούχου καλίου (KCN test).**

Ενοφθαλμίζεται ζωμός KCN (B-30) από 24ωρη υγρή καλλιέργεια του στελέχους που εξετάζεται. Βιδώνονται πολύ καλά τα πώματα και οι σωλήνες επωάζονται για 48 ώρες στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου. Οι σωλήνες εξετάζονται την 24η και 48η ώρα για την ύπαρξη ανάπτυξης (θολερότητα) η οποία υποδηλώνει θετική δοκιμή.

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να καταβληθεί όταν πρόκειται να απορριφθούν οι καλλιέργειες. Πριν από την καταστροφή προσθέτονται στους σωλήνες ένας κρύσταλλος  $\text{FeSO}_4$  και 0,1ml υδατικού διαλύματος 40% KOH.

### **2.5.7. Δοκιμή παραγωγής ουρεάσης (urease test).**

α) Μέθοδος για υγρά υποστρώματα :

Γίνεται ενοφθαλισμός υποστρώματος SSR Medium (B-94) ή Christensen's Urea Broth (B-19), το οποίο επωάζεται στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου που εξετάζεται. Οι σωλήνες με το υπόστρωμα εξετάζονται για χρονικό διάστημα 7 ημερών . Θετική είναι η δοκιμή όταν οι σωλήνες πάρουν κόκκινο χρώμα (υδρόλυση ουρίας = παραγωγή αμμωνίας =αλκαλικό pH ).

β) Μέθοδος για στερεά υποστρώματα :

Γίνεται ενοφθαλισμός στην κεκλιμένη επιφάνεια του υποστρώματος Christensen's Urea Medium(B-19), το οποίο επωάζεται στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου που εξετάζεται. Οι σωλήνες με το υπόστρωμα εξετάζονται ύστερα από 4 ώρες και καθημερινώς επί 5 ημέρες. Θετική είναι η δοκιμή όταν οι σωλήνες λαμβάνουν κόκκινο χρώμα.





Εικόνα 22β.

#### **2.5.8. Δοκιμή παραγωγής υδρόθειου (hydrogen sulfide production).**

Η δοκιμή αυτή γίνεται για τη διαπίστωση της ικανότητας των βακτηρίων να παράγουν υδρόθειο από τα θειούχα αμινοξέα ή από τις ανόργανες ενώσεις του θείου που υπάρχουν στο υπόστρωμα. Η παραγωγή του υδρόθειου γίνεται αντιληπτή από το μαύρο χρώμα των ενώσεων τις οποίες σχηματίζει με το μόλυβδο ή το σίδηρο που περιέχεται στο υπόστρωμα.

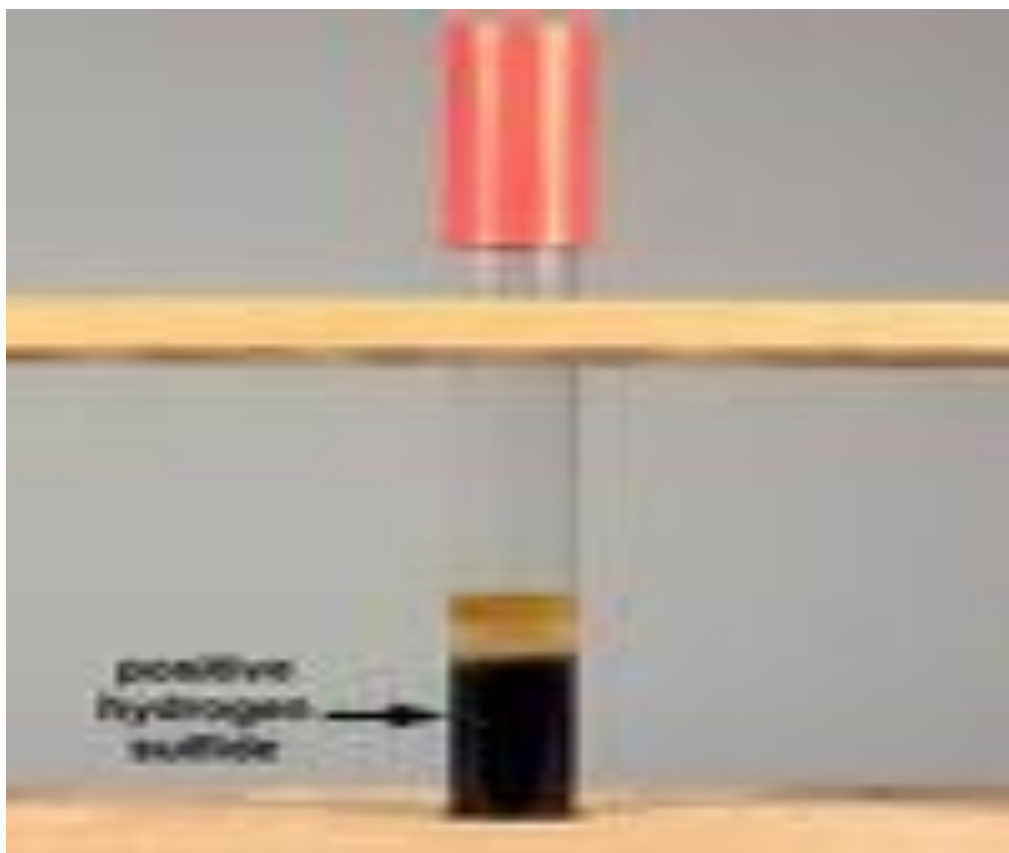
Η δοκιμή είναι δυνατό να γίνει με δύο μεθόδους :

Μέθοδος 1η: Ενοφθαλμίζεται υπόστρωμα Lead Acetate Agar. Το υπόστρωμα αυτό ενοφθαλμίζεται με ακίδα τόσο στο βυθό όσο και στην κεκλιμένη επιφάνεια και επωάζεται στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου που εξετάζεται. Οι σωλήνες ελέγχονται τη 18η και 24η ώρα και την 44η-48η ώρα της επώασης. Μαύρος χρωματισμός του υποστρώματος, υποδηλώνει θετική δοκιμή. Εάν το βακτήριο παράγει και αέριο από τη διάσπαση της γλυκόζης αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον τεμαχισμό του υποστρώματος. Στο υπόστρωμα αυτό λαμβάνεται υπόψη μόνο η παραγωγή υδρόθειου.

Μέθοδος 2η: Ενοφθαλμίζεται Kligler Iron Agar (B-40) ή Triple Sugar Iron Agar (B- 104). Τα υποστρώματα αυτά ενοφθαλμίζονται τόσο στο βυθό, όσο και στην κεκλιμένη επιφάνειά τους, επωάζονται μέχρι 7 ημέρες στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου που εξετάζεται και παρατηρούνται για την εμφάνιση μαύρου χρώματος.

Παράλληλα στο υπόστρωμα Kligler Iron Agar γίνεται εκτίμηση της ικανότητας του βακτηρίου να διασπά τη γλυκόζη (κόκκινη κεκλιμένη επιφάνεια, κίτρινος βυθός), τη λακτόζη (κίτρινο χρώμα σε όλο το υπόστρωμα) και να παράγει αέριο (τεμαχισμός του υποστρώματος).

Στο Triple Sugar Iron Agar η εκτίμηση των αποτελεσμάτων γίνεται όπως και στο Kligler, με τη μόνη διαφορά ότι ο κίτρινος χρωματισμός όλου του υποστρώματος ερμηνεύεται ως ζύμωση της λακτόζης ή της σακχαρόζης ή και των δύο.



**Εικόνα 23 α.** Παραγωγή υδρόθειου.



**Εικόνα 23β.**

### **2.5.9. Δοκιμή β-γαλακτοσιδάσης (ONPG test).**

Ενοφθαλμίζεται ζωμός ONPG (B-73) και επωάζεται για 24 ώρες. Η μεταβολή που παρατηρείται στο χρώμα του υποστρώματος, (λόγω παραγωγής ο-nitrophenol) από πορφυρό σε κίτρινο, υποδηλώνει δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης.

### 2.5.10. Αντίδραση Nagler (Δοκιμή αναστολής της λεκιθινάσης).

Το *C.perfringens* ανήκει στην ομάδα των κλωστηριδίων όπου η παραγωγή λεκιθινάσης αναστέλλεται παρουσία αντιορού της τοξίνης του *C. perfringens*.

#### Τεχνική

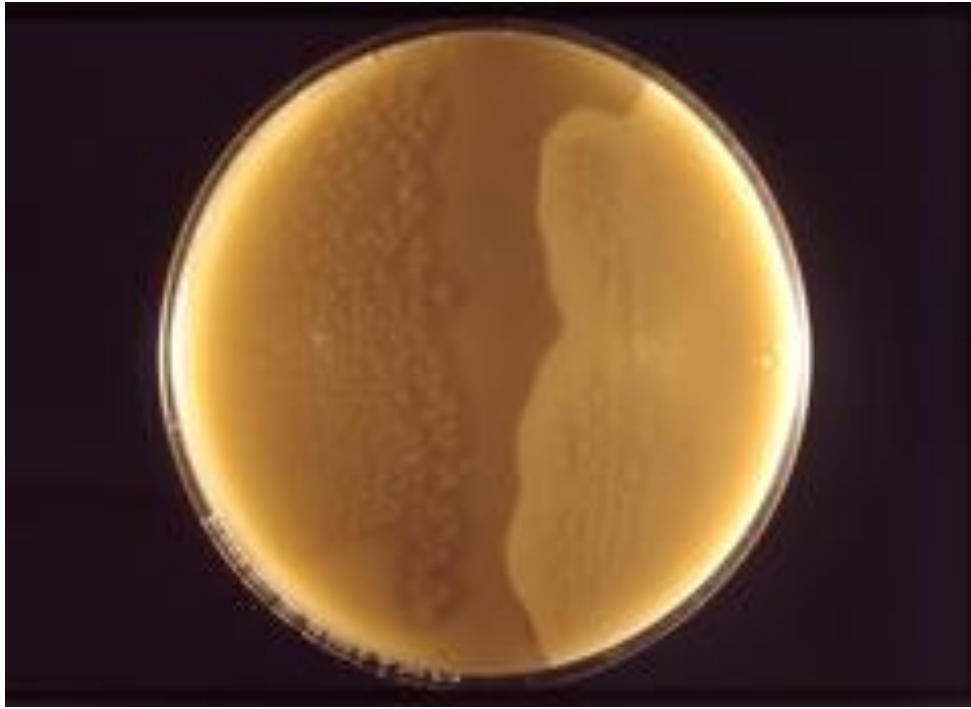
Χρησιμοποιείται το υπόστρωμα Egg Yolk Agar. Η μισή επιφάνεια ΕΥΑ επιστρώνεται με 2–3 σταγόνες αντιτοξίνης *C. perfringens* (Welcome). Το στέλεχος που ελέγχεται στη δοκιμή Nagler εμβολιάζεται σε ευθεία γραμμή αρχίζοντας από την πλευρά που δεν περιέχει αντιτοξίνη. Παράλληλα με το εξεταζόμενο βακτήριο μπορεί να εμβολιασθεί και θετικός μάρτυρας *C .perfringens*. Το τρυβλίο επωάζεται αναεροβίως στους 37οC. Σε θετική αντίδραση παρατηρείται θόλωση γύρω από τις αποικίες στην χωρίς τοξίνη πλευρά του τρυβλίου, ενώ η θολερότητα απουσιάζει στη πλευρά με αντιτοξίνη.

Εφόσον πρόκειται για *C. perfringens* (το εξεταζόμενο στέλεχος) δεν παρατηρείται δράση της λεκιθινάσης στο σημείο συμβολής του αντιορού και της αναπτύξεως του στελέχους.



**Εικόνα 24 α.** Egg Yolk Agar.





**Εικόνα 24β.** Egg Yolk Agar, *Clostridium Perfringens*.

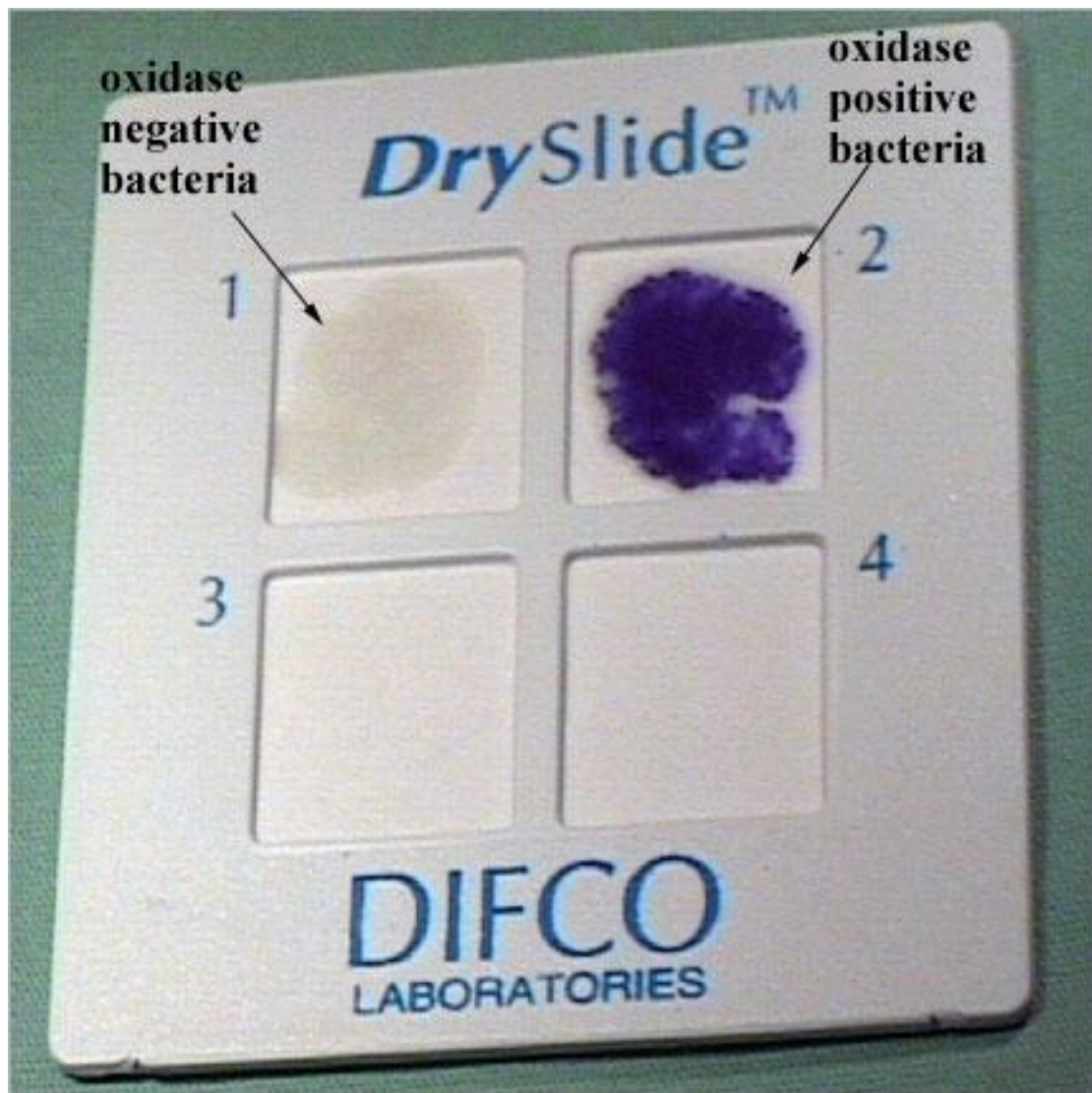


**Εικόνα 24γ.** Egg Yolk Agar, *Clostridium Perfringens*.

### **2.5.11. Δοκιμή οξειδάσης.**

Χρησιμοποιείται για την διάκριση μεταξύ των Gram αρνητικών αερόβιων οργανισμών, όπως η *Pseudomonas aeruginosa* και άλλων εντεροβακτηριακών (Enterobacteriaceae). Το αντιδραστήριο είναι διάλυμα 1% της tetra- methyl-*p*-phenylenodiamine σε νερό. Πρέπει να είναι άχρωμο ή ελαφρά ιώδες.

Το ενζυμο οξειδάση μειώνει το κυτόχρωμα για να γίνει μεταφορά της ενέργειας. Η παρουσία του κυτοχρώματος οξειδάσης μπορεί να ανιχνευθεί με τη χρήση οξειδάσης, η οποία λειτουργεί σαν ηλεκτρονικός δωρητής του κυτοχρώματος οξειδάσης. Εάν τα βακτήρια οξειδώνουν τον δίσκο (αφαίρεση ηλεκτρονίων) θα μετατρέψουν το χρώμα σε μωβ, προκαλώντας θετικό αποτέλεσμα. Καμιά αλλαγή χρώματος μας δίνει αρνητικό αποτέλεσμα.



**Εικόνα 25.** Δοκιμή οξειδωσης. Στα δεξιά θετική οξειδωση με χρώμα μπλε. Ενώ αριστερά έχουμε οξειδωση αρνητική με χρώμα άσπρο.

## **2.6 Οι εξετάσεις που γίνονται στα Νοσοκομειακά Εργαστήρια για την διάγνωση των Κλωστηριδίων είναι οι εξής:**

Η εργαστηριακή διάγνωση της λοίμωξης από *Clostridium* ειδικά (*C.difficile*) στηρίζεται στις εξής δοκιμασίες:

1. Τοξινογόνος καλλιέργεια,
2. Ανοσοενζυμική μέθοδος (ΕΙΑ), για ανίχνευση των τοξινών και της γλουταμικής δεϋδρογενάσης (ενός ενζύμου που παράγεται ειδικά από το *C. difficile*),
3. Κυτταροκαλλιέργεια, για ανίχνευση της κυταροτοξίνης Β.

### **1. Καλλιέργεια.**

Η μέθοδος της καλλιέργειας έχει γενικά μικρή ειδικότητα και προτείνεται να μην χρησιμοποιείται διαγνωστικά από μόνη της, χωρίς την ανίχνευση τοξινών.

Αντίθετα, η τοξινογόνος καλλιέργεια (δηλαδή η καλλιέργεια του δείγματος κοπράνων στα ειδικά θρεπτικά υλικά που ακολουθείται από *in vitro* προσδιορισμό της τοξινογόνου ικανότητας των θετικών αποικιών, με κυτταροκαλλιέργεια ή ανοσοενζυμική μέθοδο, [Peterson et al, 1996]) έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα στη διάγνωση πιθανής νόσου από *C. difficile*. (Barbut et al, 1993, Fedorko et al, 1999, Lozniewski et al, 2001, Staneck et al, 1996). Θεωρείται δε ότι συμβάλλει τόσο καθοριστικά στη διάγνωση, που υπολογίστηκε ότι ποσοστό μέχρι και 30% των περιπτώσεων CDAD θα μπορούσαν να διαφύγουν, αν για τη διάγνωση χρησιμοποιούνταν μόνο η ανίχνευση τοξίνης. Ένα ακόμη σπουδαίο πλεονέκτημα τη καλλιέργειας είναι ότι κατά τη διάρκεια επιδημιών είναι η μόνη μέθοδος που δίνει τη δυνατότητα απομόνωσης στελεχών *C. difficile*. Τα στελέχη αυτά ακολούθως μπορούν να τυποποιηθούν μοριακά και να ελεγχθούν για επιδημιολογικές συσχετίσεις [Peterson et al, 1996].

Το άγαρ με φρουκτόζη και προσθήκη κυκλοσερίνης και κεφοξιδίνης (σε συγκεντρώσεις 500 μg/ml και 16 μg/ml, αντίστοιχα) (Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar, CCFA), είναι ένα εκλεκτικό στερεό θρεπτικό υλικό που αναπτύχθηκε από τους George και συν. [George et al, 1979], και συστήνεται για καλλιέργειες του *C.*

*difficile* σε τρυβλία. Στο υλικό αυτό αναστέλλεται η ανάπτυξη των περισσότερων μικροβίων, χωρίς να επηρεάζεται το *C. difficile*. Η φρουκτόζη προστίθεται γιατί μεταβολίζεται από το *C. difficile* ταχύτερα από τη γλυκόζη, ενώ το ουδέτερο ερυθρό (neutral red) δρα ως δείκτης ανίχνευσης πρωτεόλυσης στο υλικό. Οι αποικίες του *C. difficile* διασπούν τις πρωτεΐνες του θρεπτικού υλικού, με αποτέλεσμα την παραγωγή αλκαλικών τελικών προϊόντων και τη μετατροπή του ουδέτερου ερυθρού σε κίτρινο.

Ένα εναλλακτικό υλικό [Brazier, 1993], που περιέχει τη μισή ποσότητα των προστιθέμενων αντιβιοτικών και χολικά άλατα είναι το CCEΥ άγαρ (Cycloserine Cefoxitin Egg Yolk Agar). Φαίνεται πως αυτό το υλικό για διάφορους λόγους πλεονεκτεί του CCFA. Καταρχήν έχει αποδειχθεί ότι ο δείκτης ουδέτερο του ερυθρού που περιέχεται στο CCFA φθορίζει σε αναερόβιες συνθήκες, με αποτέλεσμα όλες οι αναπτυσσόμενες αποικίες (ακόμη και αυτές που είναι διάφορες του *C. difficile*) να δίνουν κίτρινο φθορισμό. Επίσης, η ζύμωση της φρουκτόζης δεν είναι διαφοροδιαγνωστικό χαρακτηριστικό των κλωστηριδίων και επιπλέον τα αντιβιοτικά κυκλοσερίνη και κεφοξιτίνη, στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στο CCFA, αναστέλλουν ενίοτε και ορισμένα στελέχη *C. difficile* [Mundy et al, 1995]. Η προσθήκη ταυροχολικού ή χολικού νατρίου σε συγκέντρωση 1 gr/lit, βρέθηκε ότι διευκολύνει τη βλάστηση των σπόρων και αυξάνει την ευαισθησία και την απόδοση της καλλιέργειας [Brazier, 1993, Bliss et al, 1997].

Σε αρκετά εργαστήρια εφαρμόζεται η δοκιμασία εμπλουτισμού του δείγματος με αλκοόλη (alcohol shock ή treatment), κατά την οποία προκαλείται παραγωγή σπόρων από το *C. difficile* και ταυτόχρονα εξάλειψη της υπόλοιπης μικροβιακής χλωρίδας των κοπράνων, πριν το δείγμα ενοφθαλμισθεί στο θρεπτικό υλικό. Το υλικό που ενδείκνυται να χρησιμοποιείται μετά την επιλογή των σπόρων είναι το CCEΥ άγαρ, το οποίο περιέχει όπως αναφέρθηκε μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικών, σε σχέση με το CCFA, και επιπλέον i) χολικά άλατα, για διευκόλυνση της βλάστησης των σπόρων μετά την επίστρωση, ii) π-υδροξυφαινυλοξικό οξύ, για την παραγωγή της π-κρεσόλης, στην οποία οφείλεται η τυπική οσμή των αποικιών και iii) αίμα, για υποβοήθηση της ανάπτυξης. Τόσο η συνταγή που περιγράφηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία όσο και αρκετές παραλλαγές της είναι διαθέσιμες, από διάφορους κατασκευαστές.

Η αποθήκευση των υλικών συνιστάται να γίνεται σε πλαστικές σακούλες στους 2-8°C για σχετικά βραχύ διάστημα (μέχρι 1 εβδομάδα για το CCEY άγαρ). Τρυβλία με τα θρεπτικά μέσα είναι εμπορικά διαθέσιμα, αλλά όπως στα περισσότερα αναερόβια υλικά, ιδανικά είναι τα φρέσκα ή τα παρασκευασμένα και αποθηκευμένα σε αναερόβιες συνθήκες υλικά (prepared and stored, PRAS). Οι Peterson και συν. αναφέρουν ότι το CCFA, προανηγμένο τουλάχιστον για 4 ώρες σε αναερόβια ατμόσφαιρα, ευνοεί τη άριστη ανάπτυξη και απομόνωση του *C. difficile* από δείγματα κοπράνων ασθενών με CDAD [Peterson et al, 1996].

Οι αποικίες του *C. difficile* στο CCFA είναι διαμέτρου γύρω στα 4 mm, κίτρινου χρώματος, με εμφάνιση διαθλαστικού γυαλιού (ground glass) όταν τις παρατηρεί κανείς από κοντά με μεγεθυντικό φακό, κυκλικές με ελαφρώς ινώδη περιφέρεια και επίπεδες έως λίγο προεξέχουσες από την επιφάνεια του υλικού. Το αρχικό κίτρινο-ροζ χρώμα του θρεπτικού υλικού συχνά μετατρέπεται σε κίτρινο σε απόσταση 2-3 mm γύρω από τις αποικίες. Το *C. difficile* παράγει μια χαρακτηριστική οσμή στάβλου αλόγων, η οποία είναι ανιχνεύσιμη από τη πρωτογενή καλλιέργεια, είναι όμως ιδιαίτερα έντονη σε καθαρή ανακαλλιέργεια. Στο CCEY άγαρ οι αποικίες του *C. difficile* είναι γκριζωπές, με κέντρο το οποίο ασπρίζει, παράγουν κίτρινο-πράσινο φθορισμό σε λάμπα υπεριώδους φωτός και έχουν έντονη οσμή, εξαιτίας της παραγωγής π-κρεσόλης.

Στο CCFA μπορούν ενίοτε να αναπτύσσονται και άλλα είδη κλωστηριδίων, όπως το *C. innocuum*.

Στη Gram χρώση το *C. difficile* έχει τη μορφή ευθέων, Gram(+) βακτηριδίων, με υποτελικούς ωοειδείς σπόρους. Οι σπόροι συνήθως δεν παρατηρούνται στα εκλεκτικά υλικά, αλλά είναι χαρακτηριστικά σε ανακαλλιέργειες σε μη εκλεκτικά υλικά.

Προς την κατεύθυνση της οριστικής ταυτοποίησης του *C. difficile* μπορούν να εφαρμοστούν οι ακόλουθες δοκιμασίες. Εφόσον υπάρχει αρκετή ποσότητα μεμονομένων αποικιών στο εκλεκτικό θρεπτικό υλικό, γίνεται έλεγχος παραγωγής των τοξινών A και B (τοξινογόνος καλλιέργεια). Επίσης, σε μεμονωμένες αποικίες από το εκλεκτικό υλικό διενεργείται η δοκιμασία της αμινοπεπτιδάσης της L-προλίνης, ενζύμου η παραγωγή του οποίου αποτελεί διαφοροδιαγνωστικό χαρακτηριστικό του *C. difficile*. Δίσκοι εμποτισμένοι με L- προλίνη-β-ναφθυλαμίδη (το υπόστρωμα του

ενζύμου) έρχονται σε επαφή με τις αποικίες. Σε παρουσία του ενζύμου οι δίσκοι χρώματιζονται έντονα ροζ ως κόκκινοι. Το *C. difficile* δίνει θετική αντίδραση, ενώ το *C. innocuum* αρνητική. Άλλα βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων κάποιων κλωστηριδίων (*C. sordellii*, *C. bifermentans* κλπ.) μπορούν να δώσουν θετικά αποτελέσματα, ιδιαίτερα σε αποικίες από μη εκλεκτικά υλικά, οπότε η διάκρισή τους από το *C. difficile* γίνεται βάσει άλλων βιοχημικών και μορφολογικών κριτηρίων, όπως οι δοκιμασίες ινδόλης, λιπάσης και λεκιθινάσης και η ανάπτυξη στα εκλεκτικά θρεπτικά μέσα [Fedorko and Willems, 1997]. Χρήσιμη είναι ακόμη η ανίχνευση παραγωγής γλουταμικής δεϋδρογενάσης από ύποπτες αποικίες στο CCFA ή το CCEY άγαρ, η οποία γίνεται με ανοσοεξυμικές δοκιμασίες (EIA) ή με δοκιμασίες συγκόλλησης με latex. Το *C. difficile* δίνει θετική αντίδραση, ενώ το *C. innocuum* αρνητική. Η ευαισθησία αυτών των μεθόδων δεν είναι υψηλή (περίπου 80%) και όπως ακριβώς και στη δοκιμασία της αμινοπεπτιδάσης της L-προλίνης υπάρχουν και άλλα είδη κλωστηριδίων που δίνουν θετικές αντιδράσεις. Ωστόσο, η προσθήκη του ενζύμου προσδίδει εξαιρετική αρνητική προγνωστική αξία [Barbut et al, 2000, Alfa et al, 2002]. Τέλος, σε εργαστήρια που διαθέτουν τη σχετική υποδομή μπορεί να εφαρμοσθεί υγρή-αέρια χρωματογραφία για έλεγχο πτητικών λιπαρών οξέων από ύποπτες αποικίες (που αφαιρούνται από το υλικό μαζί με ποσότητα υποκείμενου άγαρ).

Σε κάθε εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ένα πρότυπο στέλεχος *C. difficile* (ATCC 9689 ή ATCC 17858), το οποίο ανακαλλιεργείται περιοδικά για ποιοτικό έλεγχο των υλικών, αλλά και όποτε υπάρχουν αμφιβολίες κατά την ταυτοποίηση των απομονούμενων στελεχών. Πρέπει να έχει κανείς υπόψη του ότι ένα στέλεχος 'εγκλιματισμένο' στο εργαστήριο μπορεί να αναπτύσσεται καλύτερα στα θρεπτικά υλικά από τα νέα στελέχη. Συνεπώς η ανάπτυξη του πρότυπου στελέχους προσφέρει αδρή μόνον εκτίμηση της ποιότητας των υλικών.

## 2. Προσδιορισμός των τοξινών του *C. difficile* με ανοσοενζυμική μέθοδο.

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται τόσο σε δείγματα κοπράνων όσο και επί των αποικιών, οι οποίες αναπτύχθηκαν στα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά.

Κυκλοφορούν αρκετά εμπορικά kit ανίχνευσης των κλωστηριδιακών τοξινών που στηρίζονται σε ανοσοενζυμικές μεθόδους (συστήματα μεμβράνης ή συμβατική EIA), με μικρές διαφορές μεταξύ τους. Σε αυτές τις δοκιμασίες σε γενικές γραμμές χρησιμοποιούνται πολυκλωνικά αντισώματα αιγός έναντι των τοξινών A και B (και ενίοτε και της γλουταμικής δεϋδρογενάσης). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι συγκεκριμένες μέθοδοι, αν και έχουν ελαφρώς χαμηλότερη ευαισθησία, διαθέτουν ειδικότητα συγκρίσιμη με αυτή της κυτταροτοξικότητας (η οποία θεωρείται το gold standard) (Barbut et al, 1993, Vanpoucke et al, 2001, Bentley et al, 1998, Jacobs et al, 1996, Fedorko et al, 1999, Barbut et al, 1997). Λόγω της ταχύτητας και της απλότητάς τους μπορούν να χρησιμεύσουν ως δοκιμασίες screening, ειδικά σε μικρού μεγέθους εργαστήρια. Πρέπει όμως να συνδυάζονται πάντα με καλλιέργεια, και όταν αυτή είναι θετική ενώ η αναζήτηση τοξινών αρνητική, να επαναλαμβάνονται με δείγμα τη δεύτερη φορά τις αποικίες που απομονώθηκαν.

Ένας τρόπος διάκρισης των στελεχών του *C. difficile* βασίζεται στο είδος της τοξίνης που παράγουν. Στελέχη που παράγουν και τις δύο τοξίνες (TcdA+/TcdB+) είναι κυτταροτοξικά και ευθύνονται για την πλειονότητα των περιστατικών κλινικής νόσου, στα ζώα και τον άνθρωπο. Στο παρελθόν θεωρούνταν ότι μόνο αυτά τα στελέχη ήταν παθογόνα. Ωστόσο, σχετικά πρόσφατα έγινε γνωστό ότι στελέχη που παράγουν μόνο την τοξίνη B (TcdA-/TcdB+), επίσης εμπλέκονται σε περιπτώσεις ενδοσκομομειακών λοιμώξεων, λοιμώξεων παιδιατρικών ασθενών και λοιμώξεων ανοσοκατασταλμένων [Al- Barrak et al, 1999, Kader et al, 1998, Limaye et al, 2000].



### 3. Μέθοδος κυτταροτοξικότητας.

Η μέθοδος της κυτταροτοξικότητας συνίσταται σε ενοφθαλμισμό ενός διηθήματος του εξεταστέου δείγματος κοπράνων σε καλλιέργεια κυττάρων και παρακολούθηση της κυτταροπαθογόνου δράσης (cytopathic effect, CPE), που εκδηλώνεται με καταστροφή του κυτταροσκελετού και στρογγύλεμα των κυττάρων. Η δράση αυτή επάγεται κυρίως μέσω της τοξίνης B, η οποία είναι 1000 φορές πιο κυτταροτοξική από την τοξίνη A, και εξουδετερώνεται από ειδική αντιτοξίνη. Σχεδόν όλες οι κυτταρικές σειρές, που χρησιμοποιούνται στην κλινική ιολογία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην παραπάνω μέθοδο (π.χ. κύτταρα Vero, Hep2, ινοβλάστες, CHO, HeLa). Τα κύτταρα Vero θεωρούνται τα πιο ευαίσθητα [Delmée, 2001].

Το διήθημα ενοφθαλμίζεται σε μονοστοιβάδα κυττάρων και το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα ελέγχεται μετά από 24-48 ώρες. Σε μερικές πολύ σοβαρές περιπτώσεις CDAD το κυτταροπαθολογικό αποτέλεσμα εμφανίζεται ακόμη και μετά από 4-6 ώρες. Επιβεβαίωση της ειδικότητας της μεθόδου πραγματοποιείται με σύγχρονη εφαρμογή της δοκιμασίας, αφού προστεθεί και ειδικός αντιορός έναντι του *C. difficile* (αλλά και του *C. sordelli*, το οποίο παράγει τις ίδιες τοξίνες). Συνοπτικά, όταν παρατηρείται κυτταροπαθογόνος δράση, η οποία αδρανοποιείται από την αντιτοξίνη, συμπεραίνεται η παρουσία κυτταροτοξίνης B του *C. difficile*. Σε περίπτωση που δεν παρατηρείται CPE, η παρουσία του *C. difficile* μπορεί να αποκλεισθεί σχεδόν με βεβαιότητα, καθώς η μέθοδος ανιχνεύει ακόμη και ελάχιστες ποσότητες της τοξίνης B. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η δοκιμασία πρέπει να επαναλαμβάνεται, μετά από αραίωση του αρχικού δείγματος. Όταν παρατηρείται CPE τόσο στο εξεταστέο δείγμα όσο και στο δείγμα με την αντιτοξίνη, τότε είναι πιθανόν ότι εκδηλώνεται μη ειδική κυτταροπαθογόνος δράση, οπότε η δοκιμασία επίσης επαναλαμβάνεται με μεγαλύτερες αραιώσεις του αρχικού δείγματος [Jousimies-Somer et al, 2002].

## 3<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ

### ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΑ ΣΤΑ ΖΩΑ

Τα Κλωστηρίδια είναι βακτήρια που προκαλούν ασθένειες τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο.

Μερικά από τα κλωστηρίδια είναι παθογόνα για τον άνθρωπο υπό ορισμένες συνθήκες, όπως το Κλ.της αλλαντιάσεως (*Clostridium botulinum*), το Κλ.τετανου (*Clostridium tetani*), προκαλεί τον τέτανο, το Κλ. Το διαθλαστικό προκαλεί τροφικές δηλητηριάσεις και αεριογόνο γάγγραινα (*Clostridium perfringens*, *welchii*), το *clostridium septicum*, το *clostridium oedematiens* (το οιδηματογόνο είναι υπεύθυνα επίσης για αεριογόνο γάγγραινα. Το Κλ.το δύσκολο (*Clostridium difficile*) είναι το αίτιο της ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας η οποία εμφανίζεται μετά από θεραπεία από αντιβιοτικά.

#### 3.1 ΤΑ ΠΙΟ ΣΥΝΗΘΙΣΜΕΝΑ ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΑ

##### 1. *Clostridium tetani*.

Το Κλωστηρίδιο του τετάνου έχει στρόγγυλους τελικούς σπόρους, με διάμετρο μεγαλύτερη του βακτηριδίου. Γι αυτό έχει το χαρακτηριστικό σχήμα < πλήκτρο τυμπάνου>. Την ίδια μορφολογία έχει και το μη παθογόνο *Cl.tetanomorphum*. Είναι κινητό, περιτριχο, υποχρεωτικά αναερόβιο, Gram θετικό βακτηρίδιο. Ευρίσκεται στο χώμα και τον εντερικό σωλήνα του αλόγου και άλλων ζώων.

Παράγει ισχυρή εξωτοξίνη, την **τετανοσπασμίνη**, η οποία είναι πρωτεΐνη, νευροτροπος και η οποία ελευθερώνεται μετά τη λύση του κλωστηριδίου. Είναι πολύ τοξική ουσία. Η θανατηφόρος δόση για τον άνθρωπο είναι μικρότερη από 2.5 ηg ανά κιλό βάρους. Η τετανοσπασμίνη είναι δυνατόν να εισέλθει και στους νευραξονες των συμπαθητικών νεύρων και να προκληθεί υπερδιεγερσιμότητα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος δηλαδή προκαλεί μυϊκούς σπασμούς και σπαστική παράλυση.

Εκτός της τετανοσπασμικής, το κλωστηρίδιο του τétανου παράγει και άλλη τοξίνη την τετανολυσίνη, η οποία είναι αιμολυσίνη, ευαίσθητη στο O<sub>2</sub> και αντιγονικώς παρόμοια με τη στρεπτολυσίνη. Η τοξίνη αυτή δεν έχει τοξικές ιδιότητες.

Το κλωστηρίδιο του τétανου προκαλεί στον άνθρωπο τον τétανο. Η νόσος δεν οφείλεται στη δράση του βακτηριδίου, το οποίο δεν εισέρχεται στην κυκλοφορία, αλλά σε δράση της ισχυρής εξωτοξίνης η οποία παράγεται από αυτό. Πρόκειται δηλαδή περί τοξιναιμίας. Οι σπόροι του κλωστηριδίου τétανου είναι δυνατόν να μολύνουν τραύματα. Η βλάστηση των σπόρων αυτών διευκολύνεται από την ύπαρξη νεκρωθέντων ιστών, αλάτων ασβεστίου και τη συνυπαρξη στο τραύμα και άλλων πυογόνων μικροοργανισμών. Έτσι δημιουργείται χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό που διευκολύνει την ανάπτυξη του αναερόβιου κλωστηριδίου του τétανου και την παραγωγή εξωτοξίνης η οποία μεταφέρεται προς το κεντρικό νευρικό σύστημα όπου και ασκεί την τοξική της δράση.

Ιδιαίτερα επικίνδυνα είναι τα βαθιά τραύματα τα οποία έχουν μολυνθεί με χώμα. Αλλά και εγκαύματα και επιπόλαια τραύματα είναι δυνατόν να μολυνθούν με τους σπόρους του τétανου. Σε χειρουργεία και νοσοκομεία έχουν συμβεί περιπτώσεις τétανου λόγω ανεπαρκούς αποστείρωσης χειρουργικών εργαλείων και ειδών (π.χ. ραμμάτων).

Ενίοτε παρατηρείται τétανος στα νεογνά από τη μόλυνση του ομφάλιου λώρου (νεογνικός τétανος).

Η επώαση της νόσου είναι 4-5 ήμερες, μέχρι και πολλές εβδομάδες. Κύριο σύμπτωμα της νόσου είναι οι τονικοί σπασμοί των γραμμωτών μυών. Οι σπασμοί αρχίζουν συνήθως από το μέλος του σώματος όπου είναι το τραύμα. Κατά την αρχή της νόσου εμφανίζεται σπασμός των μασητήρων μυών (τριγμός, σαρδωνειός γέλως). Γενικευμένοι σπασμοί των μυών, προκαλούν σύσπασση των ραχιαίων μυών. Πυρετός σπανίως παρατηρείται. Ο ασθενής έχει πλήρη συνείδηση. Από τον ερεθισμό των συμπαθητικών νεύρων παρατηρείται ταχυκαρδία και ιδρώτες. Ο θάνατος οφείλεται σε αναπνευστική ανεπάρκεια.

Η διάγνωση της νόσου μπορεί να γίνει από τα κλινικά συμπτώματα και το ιστορικό του ασθενούς. Η μικροβιολογική διάγνωση είναι συνήθως δύσκολη. Καταβάλλεται πάντως προσπάθεια για την απομόνωση του κλωστηριδίου του τétανου από υλικό που λαμβάνεται από το τραύμα και καλλιεργείται αναερόβως. Το κλωστηρίδιο του τétανου αναγνωρίζεται από την ύπαρξη

στρογγυλών τελικών σπόρων, τη μικρή ζώνη αιμόλυσης στο αιματούχο agar και τη μορφολογία των αποικιών. Επιβεβαίωση της απομόνωσης του γίνεται με την απόδειξη παραγωγής τοξίνης και την εξουδετέρωση της από την ομόλογο αντιτοξίνη, σε δοκιμασία επί μυών. Η προσπάθεια, όμως, εργαστηριακής διάγνωσης της νόσου δεν πρέπει να αναστείλει την προφυλακτική ή θεραπευτική χορήγηση τετανικής αντιτοξίνης.

Για τη θεραπεία του τετάνου χορηγείται τετανική αντιτοξίνη με σκοπό την εξουδετέρωση της τοξίνης. Παράλληλα χορηγούνται κατευναστικά και μυοχαλαρωτικά φάρμακα και γίνεται τεχνητή αναπνοή. Απαραίτητος είναι επίσης ο επιμελής χειρουργικός καθαρισμός του τραύματος. Η πενικιλίνη αναστέλλει την περαιτέρω ανάπτυξη του κλωστηριδίου τετάνου και την παραγωγή τετανικής τοξίνης. Ο προφυλακτικός εμβολιασμός έναντι του τετάνου, προφυλάσσει από τη νόσο σχεδόν 100%. Ως εμβόλιο χρησιμοποιείται τετανική τοξίνη η οποία έχει χάσει την τοξική της ιδιότητα με κατεργασία δια φορμόλης και μετατρέπεται σε ατοξίνη. Ο εμβολιασμός πρέπει να γίνεται κατά το πρώτο έτος της ηλικίας και συνδυάζεται με το αντιδιφθεριτικό και αντικοκκυτικό εμβόλιο (ως τριπλό εμβόλιο, DTP).

Για την ανοσοποίηση ενήλικων οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί κατά την παιδική ηλικία, όπως και για τις αναμνηστικές δόσεις, συνιστάται η χορήγηση του κατάλληλου για ενήλικες συνδυασμού τετανικής και διφθεριτικής ατοξίνης ( εμβόλιο Td).

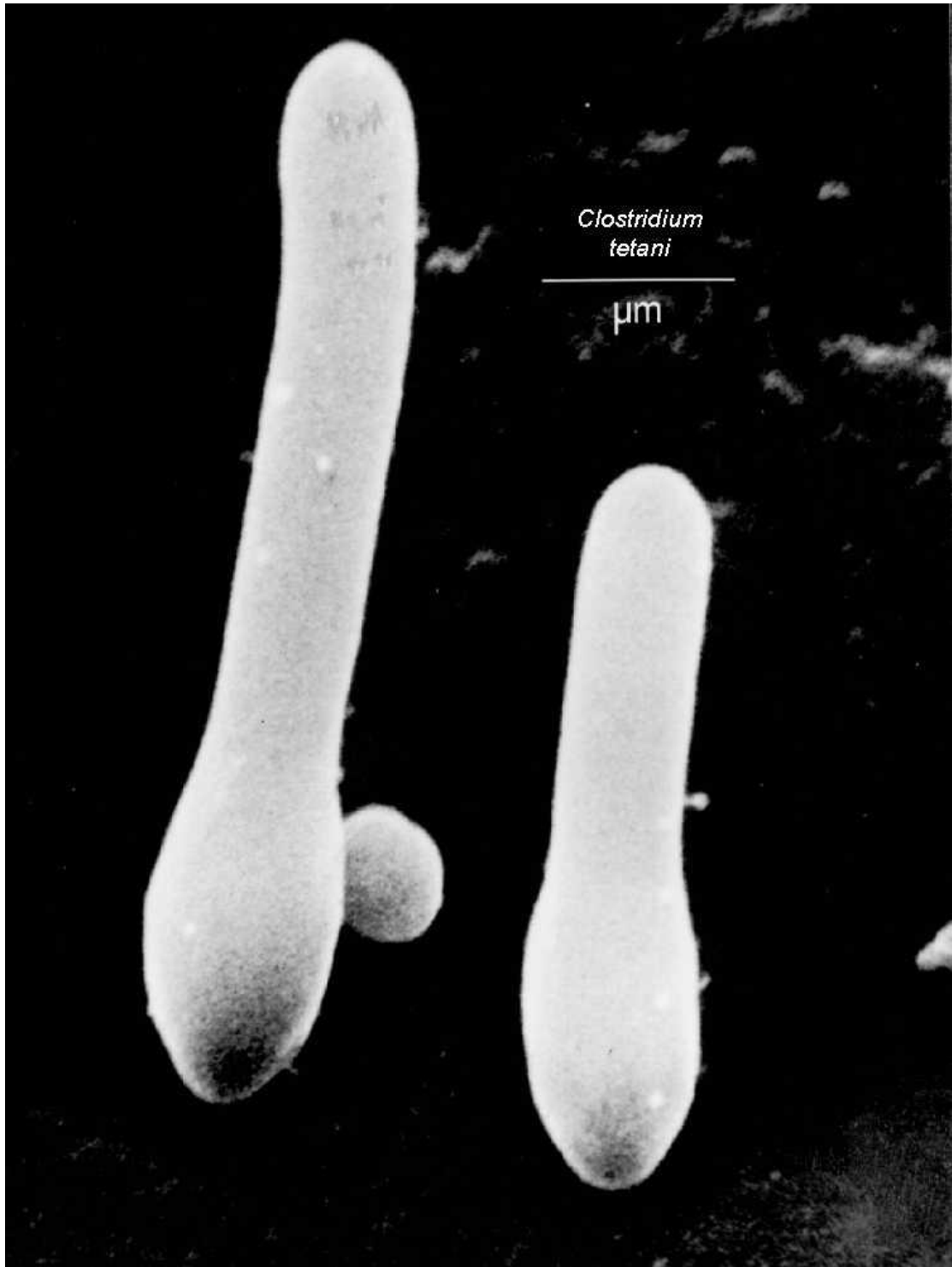
Ο νεογνικός τέτανος προλαμβάνεται με την ανοσοποίηση των γυναικών πριν από την εγκυμοσύνη η και των εγκύων κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης.



Εικόνα 26 α. **Clostridium tetani**.



Εικόνα 26 β. Νεογνικός τέτανος.



Εικόνα 26 γ. *Clostridium tetani*.

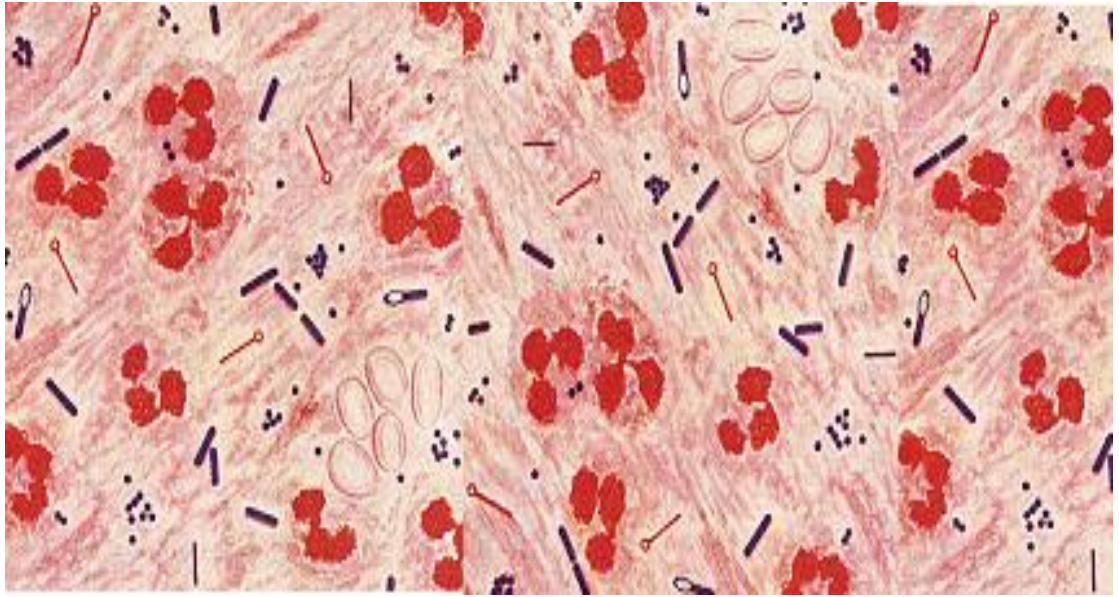
## **2. Clostridium perfringens, welchii.**

Το κλωστηρίδιο το διαθλαστικό είναι μια αναερόβια , Gram θετική σπορογόνα ράβδος ( αναερόβια μέσα σε θέση να αναπτυχθούν στην παρουσία ελεύθερου οξυγόνου). Είναι ευρέως διαδεδομένη στο περιβάλλον και συμβαίνει στο έντερο του ανθρώπου και πολλών κατοικίδιων και άγριων ζώων. Οι σπόροι του, όταν υπάρχουν είναι μεγάλοι ωοειδείς, κεντρικοί η υποτελικοί. In vitro σχηματισμός σπόρων διευκολύνεται από την έλλειψη υδατανθράκων στο θρεπτικό υλικό.

Το κλωστηρίδιο αυτό παράγει 12 τουλάχιστον διάφορες τοξίνες. Η α- τοξίνη είναι η σπουδαιότερη. Αν ενεθεί ενδοφλεβίως σε πειραματόζωα τα φονεύει, ενώ ενδοδερμική ένεση προκαλεί νέκρωση του δέρματος. Η α- τοξίνη είναι ενζυμο, λεκιθινάση, στην οποία οφείλεται η αντίδραση Nagler. Κατά την αντίδραση αυτή γύρω από τις αποικίες του κλωστηριδίου του διαθλαστικού σε θρεπτικό υλικό που περιέχει όρο αίματος η λέκιθο ωού παρατηρείται θολερότητα από τη διάσπαση των λιποπρωτεϊνών. Η α- τοξίνη αιμολυεί τα ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου και είναι η κυριότερη αιτία της καταστροφής των ιστών και της τοξιναιμίας κατά την αεριογόνο γάγγραινα.

Παράγει επίσης την εντεροτοξίνη η οποία προκαλεί την έκκριση αφθόνου υγρού στη νήστιδα και τον ειλέο και διάρροια με επακόλουθη απώλεια υγρών και ηλεκτρολυτών.

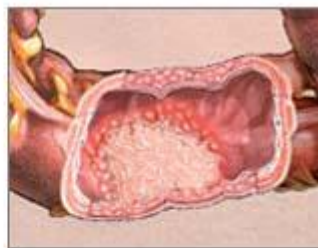
Προκαλεί επίσης νέκρωση μυών ,εντερίτιδα, και εντεροτοξιναιμία στα πρόβατα και τα βοοειδή και στον άνθρωπο προκαλεί νεκρωτική εντερίτιδα.



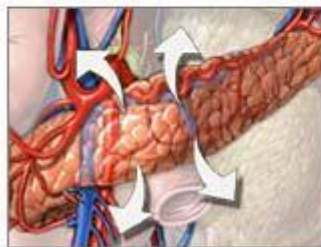
Εικόνα 27 α. *Clostridium perfringens*.



Atherosclerosis



Colon cancer



Diabetes

Patients with these diseases are more prone to developing gas gangrene

ADAM.

Εικόνα 27 β. Αεριογόνος γάγγραινα.





**Εικόνα 27 γ :** Γενικευμένη αιμορραγία στον εντερικό σωλήνα από τοξιναιμία, προσβαλλόμενη από *C. perfringens*.

### 3. Clostridium difficile.

Το κλωστηρίδιο *difficile* ( το δύσκολο) είναι σπορογόνο, αυστηρώς αναερόβιο μικρόβιο, κινητό. Επιζεί στο περιβάλλον των νοσοκομείων επί μεγάλο διάστημα. Είναι αίτιο της ψευδομεμβρανώδους εντεροκολίτιδας μετά από θεραπεία με αντιβιοτικά και ιδιαιτέρως κλινταμυκίνη.

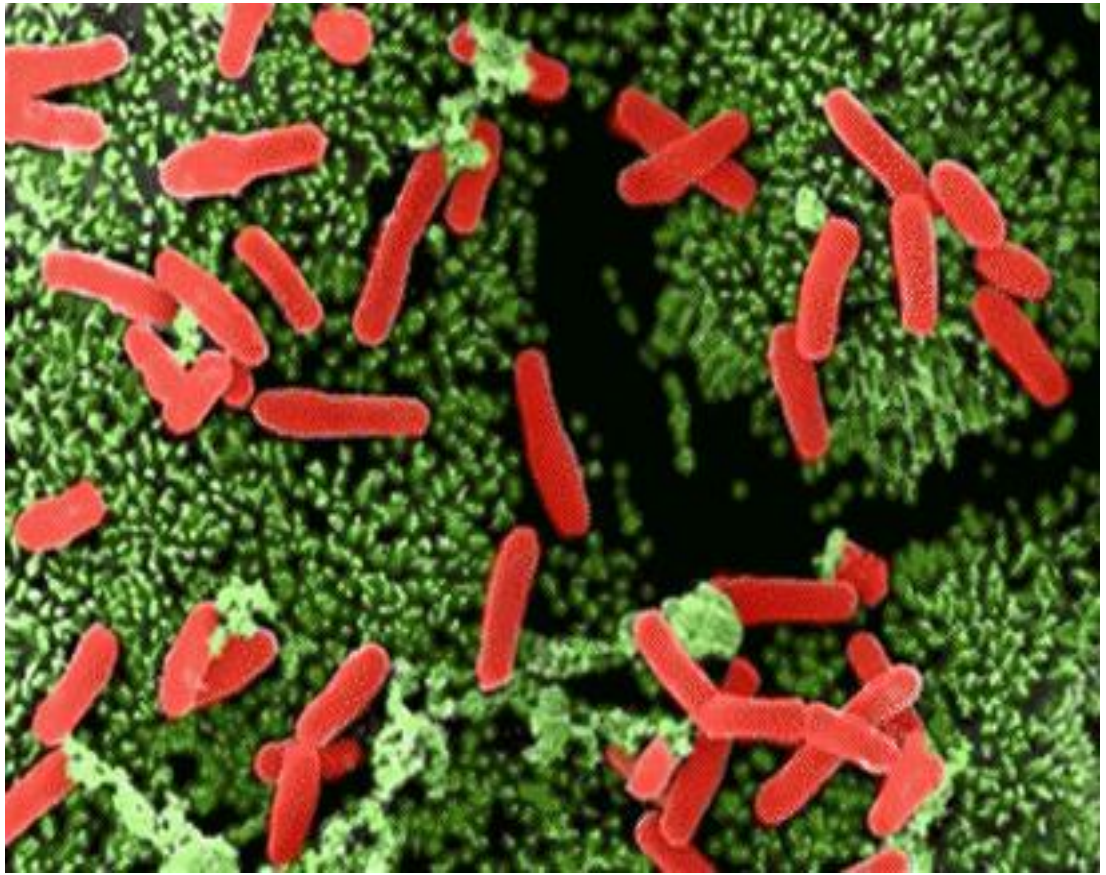
Η εντεροκολίτιδα είναι μια βαριά, και σε μερικές περιπτώσεις , θανατηφόρος νόσος που χαρακτηρίζεται από διάρροια και πολλαπλές κιτρινωλευκές πλάκες στο βλεννογόνο του κολου. Εμφανίζεται μετά από θεραπεία με αντιβιοτικά όπως κλινταμυκίνη και άλλα ευρέος φάσματος αντιβιοτικά.



Εικόνα 28 α. *Clostridium difficile*.(κιτρινωλευκές πλάκες στο βλεννογόνο του κολου). Έχουμε ψευδομεμβρανώδους κολίτιδα.



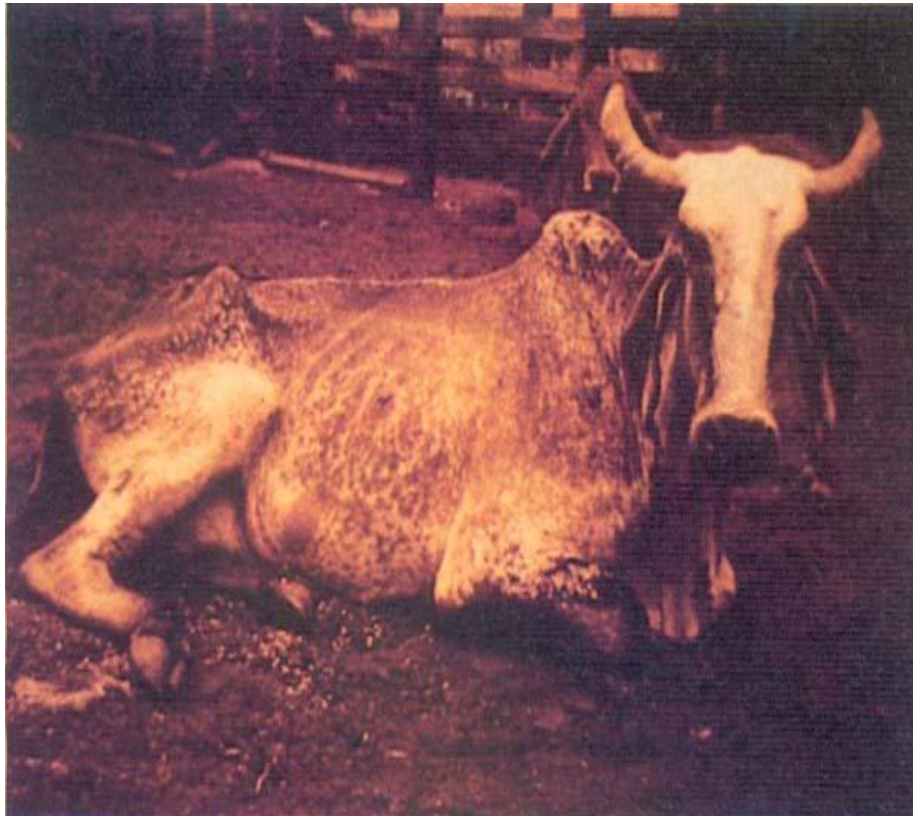
Εικόνα 28 β.*Clostridium difficile*.(κιτρινολευκες πλάκες στο βλεννογόνο του κολου.)



Εικόνα 28 γ. *Clostridium difficile*.

#### **4. Clostridium botulinum (αλλαντίαση).**

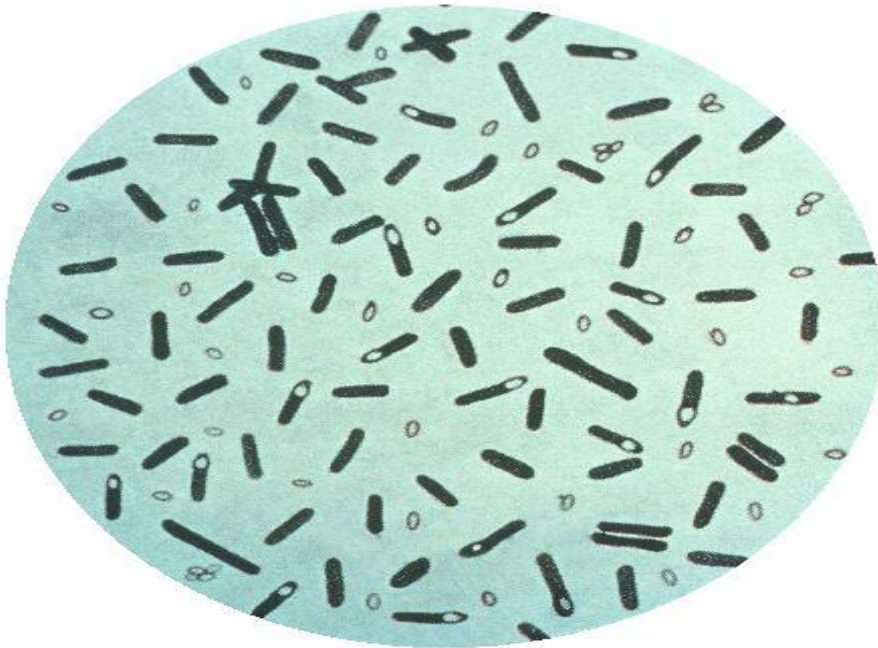
Το κλωστηρίδιο botulinum είναι μια αναερόβιο , Gram-θετική, διαθέτει σπόρια τα οποία σχηματίζουν ράβδο που παράγει μια ισχυρή τοξίνη την νευροτοξίνη. Τα σπόρια είναι ανθεκτικά στη θερμότητα και μπορούν να επιβιώσουν σε τρόφιμα που είναι λανθασμένα η ελάχιστα επεξεργασμένα. Επτά είδη της αλλαντίασης αναγνωρίζονται με βάση την αντιγονική ιδιομορφία της τοξίνης που παράγεται από κάθε στέλεχος. Τύποι Α,Β,Ε,ΣΤ, προκαλούν αλλαντίαση στον άνθρωπο ενώ οι τύποι Γ,Δ προκαλούν τις περισσότερες περιπτώσεις αλλαντίαση στα ζώα. Τα ζώα που πιο συχνά προσβάλλουν είναι η άγρια όρνιθα, τα πουλερικά, βοοειδή, άλογα και ορισμένα είδη ψαριών.



**Εικόνα 29 α. Clostridium botulinum.**



Εικόνα 29 β. *Clostridium botulinum*.



Εικόνα 29 γ. *Clostridium botulinum*.

## **3.2. Τι προκαλεί στα ζώα**

### **1.Προβατα.**

Τα πρόβατα κυρίως προσβάλλει το clostridium perfringens, septicum,tetani,difficile οι οποίες προκαλούν εντερίτιδες σε ορισμένες περιπτώσεις, επίσης προκαλεί αποβολές, οι οποίες στην χώρα μας αποτελούν πρόβλημα στην προβατοτροφία, κυρίως στα μηρυκαστικά τους τελευταίους 2 μήνες.

### **2.Αλογα.**

Προσβάλλονται από το Clostridium tetani,botulinum.Προκαλούν αποβολές στις φοράδες, ενώ στους πόλους σηψαιμία και απίσχυαση. Επίσης προκαλούν εντερίτιδες, διάρροιες με πρασινωπό χρώμα και ίχνη αίματος και αλλαντίαση.

### **3.Πτηνα.** ( ορνιθοειδή, πάπιες, χήνες, πέρδικες.)

Προσβάλλονται από το Clostridium botulinum, septicum,welchii. Στις πάπιες ,ιδιαίτερα στους νεοσσούς προκαλούν σηψαιμία , εντεριτιδα,και διάρροια.

### **4.Ανθρωπος.**

Κύρια συμπτώματα του γαστρεντερικού συστήματος είναι η διάρροια ναυτία, εμετός. Επίσης το clostridium botulinum προκαλεί κόπωση, ζάλη, κεφαλαλγία, διπλή όραση, ξηρότητα στον λαιμό και την μύτη, αναπνευστική ανεπάρκεια, κράμπες στο στομάχι, πυρετός, παράλυση και σε ορισμένες περιπτώσεις , θάνατο.

### **3.3 Νοσήματα που προκαλούνται από Κλωστηρίδια.**

#### **1. Αεριογόνος γάγγραινα.**

Αεριογόνος γάγγραινα αναπτύσσεται όταν υπάρχει μεγάλη καταστροφή ιστών, απόφραξη των αιμοφόρων αγγείων στην περιοχή του τραύματος και μόλυνση του τραύματος με χώμα περιπτώματα και άλλες ξένες ουσίες. Σπόροι κλωστηριδίων ευρίσκονται στο χώμα και στο εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων και εύκολα μπορεί να μολύνουν τα τραύματα.

Στις συνθήκες χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού των τραυμάτων αυτών οι σπόροι βλαστάνουν σε φυτικές μορφές των κλωστηριδίων. Τα κλωστηρίδια πολλαπλασιάζονται και προκαλούν ζυμωτικές αντιδράσεις με παραγωγή αερίων, δύσοσμων υγρών και καταστροφή των ιστών από τις τοξίνες και τα ενζυματων κλωστηριδίων. Οι τοξίνες επεκτείνουν τη δράση τους στους γύρους ιστούς και τους καταστρέφουν με αποτέλεσμα την επέκταση της λοίμωξης. Οι λοιμώξεις από κλωστηρίδια μπορεί να ποικίλλουν σε βαρύτητα από απλή μόλυνση του τραύματος με σχηματισμό δύσοσμων πρασινόμαυρων εσχάρων, αναερόβιο κυτταρίτιδα με επέκταση της λοίμωξης στο συνδετικό ιστό χωρίς να προσβάλλονται οι μύες, μέχρι και αεριογόνο γάγγραινα με νέκρωση των ιστών.

Τη βαρύτερη μορφή λοίμωξης από τα κλωστηρίδια αποτελεί η αεριογόνος γάγγραινα κατά την οποία προσβάλλονται οι μύες εντός των οποίων εισέρχονται τα κλωστηρίδια και τους καταστρέφουν. Η λοίμωξη επεκτείνεται στους γύρω μύς. Η επέκταση της λοίμωξης διευκολύνεται από την παραγωγή των νεκρωτικών τοξινών και της υαλουρονιδασης. Αέρια σχηματίζονται στους υποδόριους ιστούς και τους μύς. Η έναρξη της λοίμωξης είναι συνήθως αιφνίδια μετά επώαση 6-72 ωρών από τον τραυματισμό, συνοδεύεται δε από βαριά τοξιναιμία, αιμολυτική αναιμία και ίκτερο. Ακολουθεί μικροβιαίμία και θάνατος του ασθενούς.

Σε άμεσα χρωματισμένα παρασκευάσματα από το υγρό του τραύματος παρατηρούνται μεγάλα Gram θετικά βακτηρίδια. Καλλιεργείται αναερόβιως σε υγρά και στερεά θρεπτικά υλικά για την απομόνωση των Κλωστηριδίων. Η συλλογή και μεταφορά του υλικού στο εργαστήριο πρέπει να γίνει με προσοχή και κατά τρόπον ώστε να μην έλθει σε επαφή με το οξυγόνο του αέρα. Χρησιμοποιούνται στυλεοί που βυθίζονται σε κατάλληλο υλικό μεταφοράς αναερόβιων μικροβίων η αν το υλικό είναι αρκετό σε



ποσότητα, συλλέγεται με σύριγγα από την οποία έχει αφαιρεθεί ο αέρας.

Η τυποποίηση γίνεται από τη μορφολογία των αποικιών, τις βιοχημικές ιδιότητες ( ζύμωση σακχάρων και δράση επί του γάλακτος ), την παρουσία αιμόλυσης, την αντίδραση Nagler, την παραγωγή τοξίνης και την εξουδετέρωση της από ειδική αντιτοξίνη.

Θεραπεία και πρόληψη της αεριογόνου γάγγραινας συνιστάται στον επιμελή χειρουργικό καθαρισμό των τραυμάτων για την απομάκρυνση των νεκρών ιστών και των ξένων σωμάτων η και τον έγκαιρο ακρωτηριασμό του άκρου. Χορηγούνται αντιβιοτικά, ιδιαίτερος πενικιλίνη σε μεγάλες δόσεις και μετρονιδαζόλη.

## **2.Τροφική δηλητηρίαση.**

Τροφική δηλητηρίαση προκαλείται από ορισμένα θερμοανθεκτικά στελέχη του κλωστηριδίου του διαθλαστικού , τύπου A. Πρόκειται για συχνή τροφική δηλητηρίαση. Εμφανίζεται 6-18 ώρες μετά κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, από κρέας η σκευάσματα κρέατος, τα οποία μετά το μαγείρεμα έχουν παραμείνει έκτος ψυγείου και έχουν καταναλωθεί μετά νέα θέρμανση. Οι θερμοανθεκτικοί σπόροι επιζούν και κατά την παραμονή του κρέατος βλαστώνουν.

Η διάγνωση της τροφικής δηλητηρίασης γίνεται με την απομόνωση του κλωστηριδίου από τα κόπρανα του ασθενούς και το ύποπτο τρόφιμο. Η απομόνωση από τα κόπρανα διευκολύνεται από την θερμοανθεκτικότητα των σπόρων. Μικρή ποσότητα των κοπράνων εμβολιάζεται σε ζωμό αναερόβιου καλλιέργειας (Cooked-meat-broth) και βράζεται επί 15-60 λεπτά.

Για την αποφυγή των τροφικών δηλητηριάσεων ,τρόφιμα από κρέας πρέπει να ψύχονται ταχέως εντός 4 ωρών σε θερμοκρασία 4<sup>0</sup> C σε κατάλληλο ψυγείο. Πριν από την κατανάλωση συνιστάται η θέρμανση των μαγειρευμένων τροφών τουλάχιστον στους 60<sup>0</sup>C.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το βακτήριο Κλωστηρίδιο είναι εντεροβακτηριο και προσβάλλει την υγεία των ζώων και των ανθρώπων, κυρίως βρεφών και ηλικιωμένων. Ανήκει στην οικογένεια Bacillaceae και θεωρείται ότι προκαλεί πιο συχνά το φαινόμενο της γαστρεντερίτιδας στα ζώα και στον άνθρωπο. Είναι πολύ ανθεκτικό βακτήριο σε ευρύ φάσμα θερμοκρασιών , αναπτύσσεται σε pH 4,5-9 και αντέχει με τις κατάλληλες συνθήκες σε πολλά σημεία και επιφάνειες.

Η μετάδοση γίνεται μέσω της απεκκριτικής και της στοματικής οδού. Προσβάλλονται τα περισσότερα είδη των ζώων από το ζωικό βασίλειο. Υπάρχουν μερικά είδη Κλωστηριδίων τα οποία είναι παθογόνα μόνο για τα ζώα, και κάποια τα οποία είναι παθογόνα μόνο για τον άνθρωπο. Αναπτύσσονται γρήγορα σε κοινά θρεπτικά υλικά.

Με την βοήθεια των ποικίλων βιοχημικών δοκιμών και των υποστρωμάτων που υπάρχουν στην αγορά μπορεί να ταυτοποιηθεί γρήγορα το είδος του βακτηρίου που μας απασχολεί κάθε φορά. Ανάλογα με το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται δίνεται και ο ανάλογος χρωματισμός στις αποικίες του βακτηρίου με τις ζυμώσεις που επέρχονται.

Καταλήγω λοιπόν στο συμπέρασμα ότι το βακτήριο Κλωστηρίδιο είναι πολύ επικίνδυνο για τα ζώα και τον άνθρωπο. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή και φροντίδα του χώρου και των επιφανειών όπου εργαζόμαστε καθώς και στο ίδιο το προσωπικό και με τον κατάλληλο εξοπλισμό που εφαρμόζεται, ώστε να μην υπάρξουν κατάλληλες συνθήκες οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηρίου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allen D. & Baron E.( 1991) *Clostridium*. In Balows A., Hausler W.j.Jr., Herrmann K.L. ,Isenberg h. D. Shadony H.J.,(eds). Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. American Society of Microbiology. Washington D C , 50 – 505.
- Aloyff J., Jolivet - Reynaud C. (1981) Purification and charactirization of *C.perfringens* delta - toxin. Infect. Immun. 31, 536 – 546.
- Anderson, E. S., L. R. Ward, M. J. Saxe, and J. D. de Sa. (1977). Bacteriophagetyping designations of *Salmonella typhimurium*. J. Hyg. 78, 297-300.
- Arvanitidou, M., A. Papa, T. C. Constantinidis, V. Danielides, and V. Katsouyannopoulos. (1997). Theoccurrence of *Listeria spp.* and *Salmonella spp.* In surface waters. Microbiol.Res152 , 395-397
- Bacciarini L. N., Pagan O., Frey J., Grone A. (2001) *C.perfringens* beta – toxin in a African elephant with ulcerative enteritis .Vet. Rec.149(20) , 618-620.
- Bartlett J. G. (1990) Gas gangrene (other *Clostridium*-associated diseases). Churchill Livingstone.38 , 222.
- Bartsch A. and Walker H. (1982) Effect of temperature, solute and pH on the tolerance of *C.perfringens* to reduced water activities. J. Food Sci. 47,1754-1755.
- Beaman G., Koskikawa K., Pankratz I. and Gerhardt M., (1984) Dehydration partitioned within core protoplast accounts for heat resistance of bacterial spores. FEMS Microbiology Letters. 24 , 47-51.
- Beerens H. ahd Delcoudre F. (1985) Caractere differential entre *C.perfringens* fecal et tellurique. Am. Inst. Pasteur. Lille.95, 739-740.
- Bezirtzoglou E., Konstandi M., Voidarou C., Kostakis D., and Marselos M. (1999). Influence of psychological stress on the faecal carriage of indicator bacteria. Microecology and Therapy.28, 49-53.
- Bezirtzoglou E., Dimitriou D and Panagiou A. (1996). Occurrence of *C perfringens* in river water by using a new procedure. Anaerobe 2, 169-173.
- Bezirtzoglou E., Panagiou A., Savvaidis I., Maipa V. (1997). Distribution of *Clostridium perfringens* in polluted lake environments. Anaerobe.3 ,169-172..

- Bisson J.W. and Cabelli V.J. (1980). *Clostridium perfringens* as a water pollution indicator. J. Water Pollut. Control Fed.52 , 241.
- Bidwell E. (1950) Proteolytic enzymes of *C.welchii*.Biochem. J. 46 , 589-598.
- Brooks M. E., Moore N.E.C. (1961) Gas chromatographic analysis of amines and the other compounds produced by several species of *Clostridium*. Can. J. Microbiol. 15, 1433.
- Bryant F. (1969) What the sanitaria should know about *C.perfringens* foodborne illness. J. Milk. Food . Tech.32 , 382-389.
- Buxton D. (1978) Further studies on the mode of action of *C.welchii* type D epsilon toxin. J Med. Microbiol.11 , 293.
- Collee J. (1975) In medical microbiology,367-76. Edinburgh and London.
- Cygan Z. and Jastrebski T. (1969) Species identification of *Clostridial* strains isolated from the tissues of healthy animals. Med. Vet. 25 , 338-341.
- Doyle M., Beuchat L., Montville T. (2001) Food Microbiology . Fundamentals and frontiers 2nd ed. American Society for Microbiology.5, 129-158 & 305-326.
- Duncan C. L., Labbe R.C., and Reich R. R. 1972 Germination of heat and alkali seltered spores of *C. perfringens* type A by lysozyme and an initiation protein. J. Bacteriol. 109, 505-559.
- Eisgruber H., Reuter G. (1987) Anaerobic spore formers in commercial spices and ingredients for infant food. Z Ledensm Unters Forsch. 184(4) , 281-287.
- Genigeorgis C. (1975) Public health importance of *C. perfringens* J. AYMA. No.1, 178-185.
- Genigeorgis C., Sakaguchi G. and Riemann H. (1973). Assay methods for *C. perfringens* type A enterotoxin. Appl. Microbiol. 26 ,111-115.
- Gkiourtzidis L., Frey J., Bourtzi-Hatzipoulou E., Iliadis N., and Sarris K. (2001) PCR detection and prevalence of  $\alpha$ -, $\beta$ -, $\beta$ 2-, $\epsilon$ -, $\iota$ - and enterotoxin genes in *C.perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. Vet. Microbiol.( in press ).
- Gorbach S.L. , Bartlett J. G. (1973). Anaerobic infections .N. Engl. J. Med.83, 377.
- Gough B. and Alford J. (1965) Effect of curing agents on the growth and survival of food- poisoning strains of *C.perfringens* J. Food Sci 30 , 1025-1028.

- Granum P. E. (1987). *C.perfringens* toxins involved in food poisoning. Int. J. Food Microbiol. 10 ,101-112.
- Hall W.M., Witzerman J.S. and James R. (1969) The detection and enumeration of *C. perfringens* in foods. J. Food Sci. 34, 212-214.
- Hatheway C. L. (1990). Toxigenic *Clostridia* .Clin. Microbiol.Rev.3, 66.
- Hauschild A., Walcraft M. and Campbell W. (1971). Emesis and diarrhea induced by enterotoxin of *C. perfringens* type A in monkeys . Can. J. Microbiol.17, 1141-1143.
- Σκούφος Ι., (2002). Λοιμώδη νοσήματα και υγιεινή των ζώων, (τόμος Α). ΣχολήΤεχνολόγων Γεωπονίας, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, ΤΕΙ Ηπείρου σελ 1-210.
- Σκούφος Ι., (2002). Λοιμώδη νοσήματα και υγιεινή των ζώων, (τόμος Β). ΣχολήΤεχνολόγων Γεωπονίας, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, ΤΕΙ Ηπείρου, σελ 211-320.
- Smith H.W. and Crabb W.E. (1972). The faecal bacterial flora of animals and man: It's development in the young. J. Pathol. Bacteriol. 82, 53-66.
- Smith J. & Williams B. (1984). Clostridia in the Pathogenic Anaerobic Bacteria. Charles C. Thomas, Springfield.11, 101-136.
- Stark R.I and Duncan C.L (1971). Purification and biochemical properties of *C.perfringens* type A enterotoxin. Infect. Immu. 6, 662-673.
- Sterne M. and Warrack G.H. (1964). The types of *C.perfringens* J. Pathol. Bacteriol.88, 279-283.
- Stiles B G. and T.D. Wilkins (1986). *C. perfringens* iota toxin: synergism between two proteins. Toxicon. 24, 767-773.
- Strong D.H, Foster E.F & Duncan C.L (1966). Influence of water activity on the growth of *C. perfringens*. Appl. Microb. 19, 980-987.
- Strong D.H., Duncan C.L. and Perna G. (1970). *C. perfringens* type A food poisoning II. Response of the rabbit ileum as an indication of enteropathogenicity of strains of *C. perfringens* in human beings. Infect. Immun. 15, 645-650.
- Thatcher F.S. & Clark D.S (ed) (1968). Microorganisms in foods. University of Toronto Press.127-138.
- Titball R.W. and Ro. Bidge T. (1990). The role of histidine residues in the alpha toxin of *C. perfringens*. FEMS Microbiol. Lett 56, 261-265.
- Titball R.W. (1993). Bacterial phospholipases. Microbiol Rev. ,57: 347-366.

- Titball, R.W. (1997). Bacterial phospholipase. Trends Microbiol. 7, 265.
- Τζώρα Αθηνά., (2002). Μικροβιολογία και Ανοσολογία των αγροτικών ζώων. Σχολή Τεχνολόγων Γεωπονίας, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, ΤΕΙ Ηπείρου, σελ. 1-172
- Turscan J., Varga I., Turscan Z., Szigeti J., Farkas L. (2001). Occurrence of anaerobic bacterial, *Clostridial*, and *C. perfringens* spores in raw goose livers from a poultry processing plant in Hungary. J Food Prot. 64 81 , 1252-4.
- Uemura T., Genigeorgis C., Riemann H.P. and Franti C. (1974) Antibody against *C. perfringens* in human sera. Inf. Immun. 9, 470-471.
- Vassos D. V. (2004) Foods & health of the consumer. Food disturbances. 1st ed Papasotiriou (Athens), 39-68.
- Volkova V.P., Verner O. M., Sinyak K. M. (1988). The effect of carbohydrates on the sporogenesis of *C. perfringens* and *Bacillus anthracis*. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 32(4), 447-56.
- Willis A. T, Smith G.R(1990). Gas gangrene and other *Clostridium* infections of man and animals. Bacterial diseases. Principles of Bacteriology. Virology and Immunology 8 126 th ed. 3, 308.
- Willis A. (1969) Clostridia of wound infection. Butterworth and Co. London. 22, 705-
  
- Wilson R., Kanto N.P., McCarthy B.J. et al. (1981) Epidemiologic characteristics of necrotizing enterocolitis. Am. J. Epidemiol. 114 , 880.
  
- Yamagishi T., Serikawa T., Morita R., Nakamura S. and Nishida S. (1971) Persistent high numbers of *C. perfringens* in the intestines of Japanese aged adults. Jap. J. Microbiol. 20, 397.
  
- Zogaris S., Papandropoulos D., Alivizatos C., Rigas G., Hagirvasanis V., Kardakari N.

[http://www.umu.se/cm/6\\_Avhandlingar/Palmgren\\_abstract.htm](http://www.umu.se/cm/6_Avhandlingar/Palmgren_abstract.htm)

<http://www.salmonella.org/info.html>

<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html>

<http://www.about-salmonella.com/>

<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-16.html>

<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>

<http://www.splammo.net/bact102/102xsal.html>

