



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Δ.Π.Μ.Σ. ΚΑΤΑΡΧΗΜΕΙΑ ΚΑΤΑΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΠΡΟΚΑΘΑΡΤΗ ΤΟΥΤΕΝΟΥΣ ΣΗΛΙΟΥ
ΕΙΔΟΥΣ *Clostridium perfringens* ΣΤΟ ΒΙΟΤΟΠΟ ΤΟΥ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΤΥΠΩΝ
ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΣΤΟΝ ΚΟΛΩΟ ΤΟΥ ΑΜΕΡΑΚ

ΧΑΡΟΥΛΑ ΛΙΘΗΤΟΥ

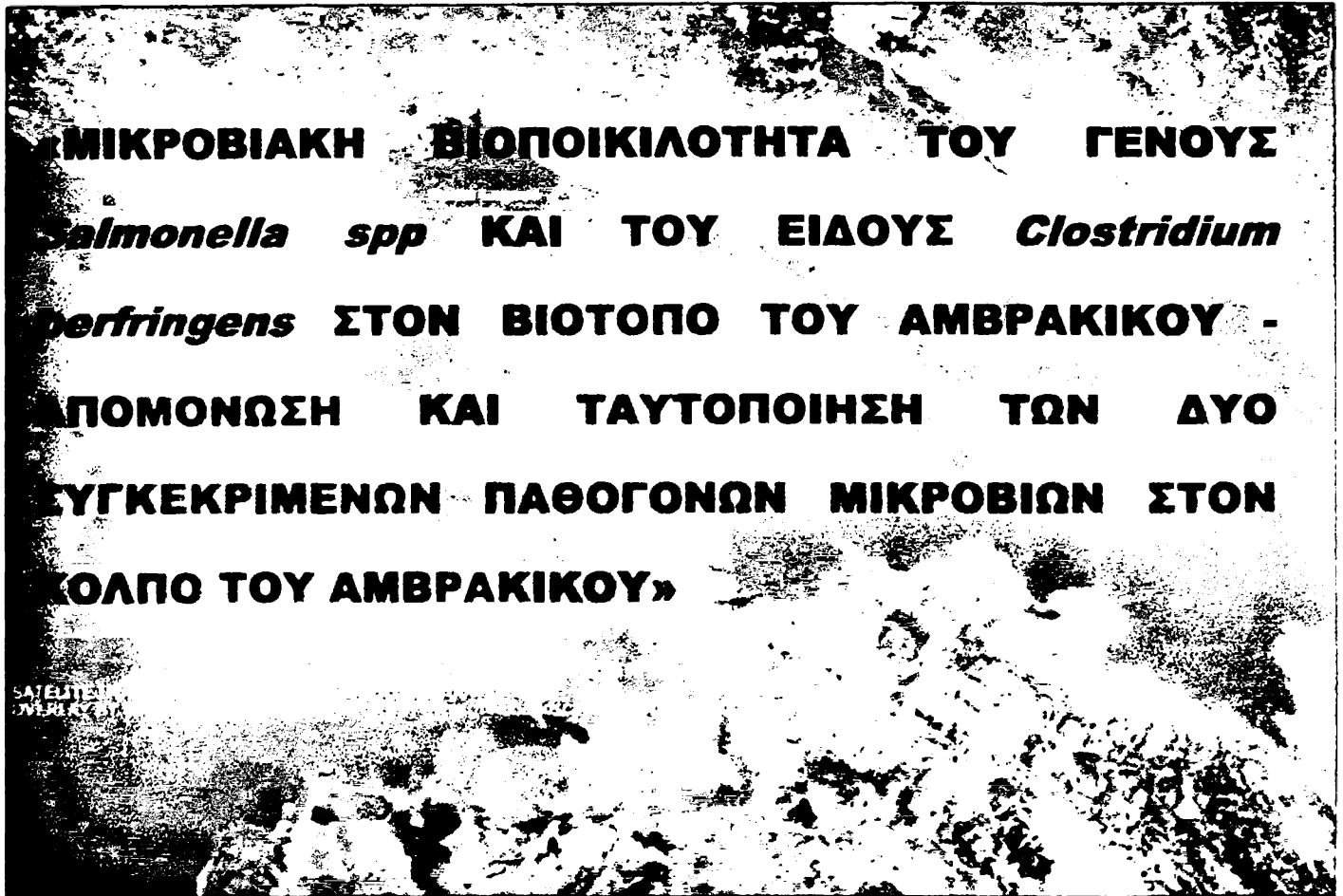
Δ.Π.Μ.Σ.

ΠΡΩΤΟΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΚΟΥΦΟΣ, Αναστασίου Κρήνη
Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Τ.Ε.Ι. Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007





ΧΑΡΟΥΛΑ ΛΙΟΝΤΟΥ

ΑΜ: 48

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΚΟΥΦΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής

Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Τ.Ε.Ι Ηπείρου

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική αυτή εργασία είναι το αποτέλεσμα μιας επίπονης και επίμονης προσπάθειας, οπότε θεωρώ υποχρέωσή μου να αναφερθώ σε όλους αυτούς που συνέβαλαν καθοριστικά στην πραγματοποίησή της. Θέλω μέσα από αυτές τις γραμμές να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν με τις πολύτιμες συμβουλές τους, αλλά και με την σημαντική προσφορά τους.

Πρωταρχικά θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω θερμά την Τριμελή Επιτροπή για την αξιολόγηση της διπλωματικής διατριβής και ιδιαίτερα τον υπεύθυνο καθηγητή μου, Αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου Δρ. Ιωάννη Σκούφο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το θέμα της διπλωματικής διατριβής, την πολύτιμη βοήθεια του στην προετοιμασία και οργάνωσή της, την πρόθυμη και υπομονετική καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής της και την αμέριστη συμπαράσταση του. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Δρ. Αθηνά Τζώρα, Καθηγήτρια του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου, για την παραχώρηση του εργαστηρίου της Μικροβιολογίας, Παρασιτολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, όπου εκπονήθηκε το πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής. Ευχαριστώ ιδιαίτερω την κ. Κωνσταντίνα Φώτου και την κ. Χρυσούλα Βόιδαρου επιστημονικούς συνεργάτες του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου για τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου της διπλωματικής μου διατριβής, τις συνεχείς υποδείξεις τους κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς και για την ηθική συμπαράσταση τους σε όλο το διάστημα της συγγραφής αυτής της εργασίας.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Δ.Π.Μ.Σ «ΓΕΩΡΓΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ», του τμήματος Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Αιγαίου, Μαρία Σαλέπη για την άρτια συνεργασία μας κατά τη διάρκεια των παρεμφερών πειραμάτων μας και την σημαντική βοήθειά της στο διάστημα αυτό.

Τέλος, ευχαριστίες αλλά και ευγνωμοσύνη θα ήθελα να εκφράσω σε όλους εκείνους που με στήριξαν υλικά και κυρίως ηθικά σε όλο το χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Χαρούλα Λιόντου

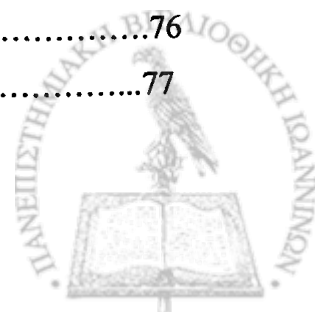


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΕ ΥΔΑΤΙΝΑ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ.....	8
A) SALMONELLA SPP.....	8
1. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ENTEROBACTERIACEAE.....	8
2. GRAM-ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΑΙΡΕΤΙΚΑ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ	9
2.1 Το γένος <i>Salmonella</i> – Ταξινόμηση.....	11
2.2 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες.....	12
2.3 Παθογένεια.....	16
2.4 Πηγές μόλυνσης.....	20
2.4.1 Μέτρα προφύλαξης από τη μόλυνση.....	20
3. Κατανομή του <i>Salmonella spp</i> στα άγρια πουλιά και ζώα.....	21
4. Βιοχημικές ιδιότητες- Απομόνωση και ταυτοποίηση σαλμονέλων.....	23
4.1 Απομόνωση του γένους <i>Salmonella</i> (Fda, 1976).....	25
4.1.1 Φάση μη εκλεκτικού εμπλουτισμο (προεμπλουτιστική).....	25
4.1.2 Φάση εκλεκτικού εμπλουτισμού.....	27
4.1.3 Φάση απομονώσεως.....	27
5. Ταυτοποίηση του γένους <i>Salmonella</i>	28
5.1 Προκαταρκτικός βιοχημικός έλεγχος.....	28
5.2 Προκαταρκτικός ορολογικός έλεγχος.....	30
5.3 Πλήρης βιοχημικός έλεγχος.....	31
B) CLOSTRIDIUM PERFRINGENS.....	35
1. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ BACILACEAE.....	35
2. ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΚΟΚΚΟΙ ΠΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΥΝ ΕΝΔΟΣΠΟΡΙΑ.....	35
3. Γένος <i>Clostridium</i>	35
4. Μελέτη του είδους <i>Clostridium perfringens</i>	39



4.1 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες.....	39
4.2 Καλλιεργητικοί χαρακτήρες.....	41
4.3 Παθογένεια.....	43
4.4 Βιοχημικές ιδιότητες.....	44
4.5 Σπόροι του <i>C. perfringens</i>	45
4.6 Αντιγόνα -Τοξίνες.....	46
4.6.1 Κύριες τοξίνες.....	49
4.6.2 Δευτερεύουσες τοξίνες.....	50
4.6.3 <i>Clostridium perfringens</i> εντεροτοξίνη.....	52
5. Κατανομή του <i>Clostridium perfringens</i> στο περιβάλλον.....	52
6. Εργαστηριακή διάγνωση του <i>C. perfringens</i>	57
6.1.1 Μέθοδος ενσωμάτωσης.....	57
6.1.2 Μέθοδος επιφανειακή εξαπλώσεως.....	58
6.1.3 Μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων.....	59
6.2 Ταυτοποίηση.....	60
6.2.1 Προκαταρκτική ταυτοποίηση.....	60
6.2.2 Αντιβιογράμμα (ευαισθησία με την τεχνική δίσκων).....	60
6.2.3 Βιοχημικές δοκιμασίες.....	61
6.2.4 Ορθόδοξη ταυτοποίηση.....	62
6.2.4.1 Έλεγχος των τελικών μεταβολικών προϊόντων.....	62
6.2.4.2 Βιοχημική ταυτοποίηση.....	63
6.2.5 Νέες μέθοδοι ταυτοποίησης του <i>C.perfringens</i>	63
6.2.6 Συστήματα επώασης αναερόβιων καλλιεργειών.....	64
II. ΠΕΡΙΟΧΗ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΜΕΛΕΤΗΣ	65
1. Περιοχή μελέτης.....	65
1.2 Είδη μελέτης.....	69
III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	76
1. Σκοπός πειράματος.....	76
2. Υλικά και μέθοδος απομόνωσης για το γένος <i>Salmonella</i>	76
2.1 Απαιτούμενα υλικά.....	76
2.2 Δειγματοληψία.....	77



2.3 Εξέταση των δειγμάτων στο εργαστήριο - Μέθοδος απομόνωσης του γένους <i>Salmonella spp</i>	77
3. Υλικά και μέθοδος απομόνωσης για το είδος <i>C. perfringens</i>	82
3.1 Απαιτούμενα υλικά.....	82
3.2 Δειγματοληψία.....	83
3.3 Μέθοδος απομόνωσης και ταυτοποίησης για το είδος <i>C. perfringens</i>	83
4. Υποστρώματα.....	86
5. Βιοχημικές δοκιμές.....	91
5.1 Δοκιμή κινητικότητας (motility test).....	91
5.2 Δοκιμή ινδόλης (indole test).....	92
5.3 Δοκιμή ερυθρού του μεθυλίου (methyl red test ή mr test).....	92
5.4 Δοκιμή Voges - Proskauer ή vp (Ανίχνευση ακετυλομεθυλοκαρβινόλης).....	93
5.5 Δοκιμή χρησιμοποίησης των κιτρικών αλάτων (citrate utilization test).....	94
5.6 Δοκιμή αναπτύξεως παρουσία κυανιούχου καλίου (kcn test).....	94
5.7 Δοκιμή παραγωγής ουρεάσης (urease test).....	95
5.8 Δοκιμή παραγωγής υδρόθειου (hydrogen sulfide production).....	95
5.9 Δοκιμή β-γαλακτοσιδάσης (onpg test).....	96
5.10 Αντίδραση Nagler (Δοκιμή αναστολής της λεκιθινάσης).....	97
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	98
V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	119
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	121



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ» με θέμα «Γεωργία, Περιβάλλον και Βιοποικιλότητα σε Γεωργικά Αγροοικοσυστήματα της Δυτικής Ελλάδας» που εκπονείται στο χώρο του μικροβιολογικού εργαστηρίου του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τ.Ε.Ι Ηπείρου, σε συνεργασία με το Τμήμα Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Αιγαίου.

Το αντικείμενο της έρευνας αποτέλεσαν η διερεύνηση της βιοποικιλότητας μικροβιακών οργανισμών, όπως το γένος *Salmonella spp* και το είδος *Clostridium perfringens* στο οικοσύστημα του Αμβρακικού κόλπου και η απομόνωσή τους στο έδαφος, το νερό και κυρίως στα περιττώματα άγριων πτηνών που φιλοξενούνται σε αυτόν.

Η παρούσα μελέτη έγινε με την επίβλεψη του Αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής Ηπείρου, Δρ. Ιωάννη Σκούφο και της Καθηγήτριας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τ.Ε.Ι Ηπείρου Δρ. Αθηνάς Τζώρα, amφότεροι μέλη της κύριας ερευνητικής ομάδας του Προγράμματος.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Συνοψίζοντας όλα όσα αναφέρθηκαν στην παρούσα μελέτη, σκοπός της πραγμάτωσής της είναι να διαπιστωθεί πόσο συμμετέχουν στη μικροβιακή βιοποικιλότητα της περιοχής του Αμβρακικού κόλπου τα άγρια και υδρόβια πτηνά σε σχέση με την ύπαρξη στο οικοσύστημα δύο παθογόνων μικροβίων, της *Salmonella spp* και του *C. perfringens* και σε ποιές περιόδους η παρουσία τους είναι εντονότερη.

Οι δειγματοληψίες των υπό μελέτη περιττωμάτων των άγριων σπονδυλωτών πτηνών έγιναν κυρίως τα έτη 2004 και 2005. Η επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τις δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκε στο μικροβιολογικό εργαστήριο του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του ΤΕΙ Ηπείρου. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν 60 δείγματα από περιττώματα άγριων πτηνών από τον Σεπτέμβριο του 2005 έως τον Μάιο του 2006.

Από τα εξήντα (60) δείγματα των άγριων πτηνών τα δεκαέξι (16) ήταν θετικά για το παθογόνο μικρόβιο *Salmonella* (ποσοστό περίπου 27%), ενώ τα δεκατρία (13) από τα εξήντα (60) δείγματα βρέθηκαν θετικά για τις βλαστικές μορφές του παθογόνου μικροβίου *C. perfringens* (ποσοστό περίπου 22%) και δεκαπέντε (15) από τα εξήντα (60) θετικά για τους σπόρους του (ποσοστό περίπου 25%).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι τα παθογόνα μικρόβια *Salmonella spp* και *C. perfringens* υπάρχουν σε μεγάλα ποσοστά στα άγρια πτηνά και ζώα που φιλοξενούνται στην περιοχή του Αμβρακικού κόλπου και θεωρείται σκόπιμο να ληφθούν σοβαρά μέτρα για τη σωστή διαχείριση της περιοχής, ώστε να μειωθούν σημαντικά τα ποσοστά των δύο αυτών βακτηρίων. Τα δύο αυτά βακτήρια αποτελούν σημαντικούς δείκτες μόλυνσης του οικοσυστήματος καθόσον είναι αμφοτέρα εδαφογενή και υδατογενή και με εύκολη εξάπλωση σε πληθυσμούς παραγωγικών ζώων, όπως και του ανθρώπου.



I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΕ ΥΔΑΤΙΝΑ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

A) SALMONELLA SPP

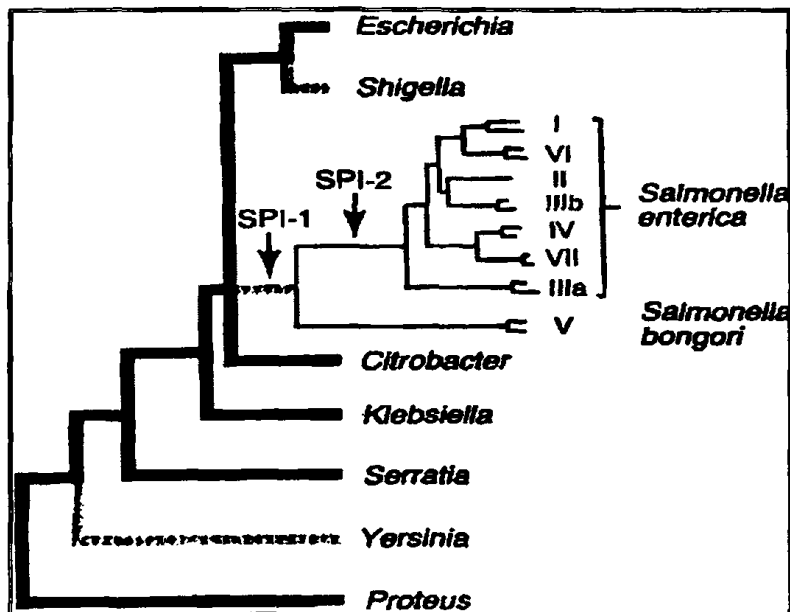
1. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ENTEROBACTERIACEAE

Η οικογένεια αυτή είναι η μεγαλύτερη ομάδα από τα μη φωτοσυνθετικά *Gram* αρνητικά βακτήρια. Είναι όλα ραβδοειδή ευθύγραμμα ή καμπυλοειδή, ορισμένα είναι ακίνητα ενώ τα περισσότερα κινούνται με μαστίγια που μπορεί να είναι περίτριχα, πολικά ή μεικτού τύπου (πολικά και περίτριχα). Η κατανομή της δίνει τη δυνατότητα διάκρισης αυτών των βακτηρίων με την προαιρετική αναερόβια ανάπτυξη. Σε αναερόβιες συνθήκες η ενέργεια προέρχεται από τη ζύμωση σακχάρων ενώ σε αερόβιες συνθήκες, για την οξειδωτική αναπνοή, χρησιμοποιείται μεγάλη ποικιλία οργανικών ενώσεων (οργανικά οξέα, αμινοξέα, υδατάνθρακες). Ο πιο συνηθισμένος τύπος ζύμωσης στα εντεροβακτήρια είναι η ζύμωση μείγματος οξέων (mixed acid fermentation) με την οποία σχηματίζονται τα οξέα γαλακτικό, οξικό, ηλεκτρικό και μυρμηγκικό (ή CO₂ και H₂) καθώς και αιθυλική αλκοόλη (Holt, 1974). Ο σχηματισμός αερίου σαν αποτέλεσμα της ζύμωσης του σακχάρου είναι ιδιότητα χρήσιμη για την ταυτοποίηση των διάφορων μελών των εντεροβακτηρίων: το γένος *Escherichia* που συσσωρεύει αέρια, αναγνωρίζεται από τα παθογόνα της του γένους *Shigella* και από το είδος *Salmonella typhi* τα οποία ζυμώνουν τα σάκχαρα χωρίς να δημιουργούν αέρια. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται καλά στους 37°C. Ωστόσο πολλά είδη αναπτύσσονται καλύτερα στους 25-30°C και είναι συχνά περισσότερο ενεργά μεταβολικά σε αυτές τις θερμοκρασίες. Τα εντεροβακτήρια είναι αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και θετικά στην δοκιμή της καταλάσης εκτός από τη *Yersinia dysenteriae* και είδη του γένους *Xenorhabdus* όπως το *X. Luminescens* (Katsogianopoulos, 1996). Η κατανομή τους είναι σε παγκόσμιο επίπεδο. Βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό, τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, τα φυτά και τα δέντρα και στα ζώα από τα σκουλήκια και τα έντομα μέχρι και τον άνθρωπο (Vassos, 2004).

Με βάση κριτήρια βιοχημικά (όπως το αν παράγεται το ένζυμο καταλάση και οξειδάση), μορφολογικά (τύπος μαστιγίων) και γενετικά (ομόλογες αλληλουχίες βάσεων), η οικογένεια Enterobacteriaceae περιλαμβάνει τα παρακάτω γένη (Holt, 1974):



Salmonella, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Habnia*, *Serratia*, *Erwinia*, *Arsenophonus*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Ewingella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pragia*, *Prividencia*, *Rahnella*, *Tatumella*, *Yokenella*, *Xenorhabdus*. Ενδιαφέρον για την μικροβιολογία παρουσιάζουν κυρίως τα γένη : *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia* και *Erwinia*.



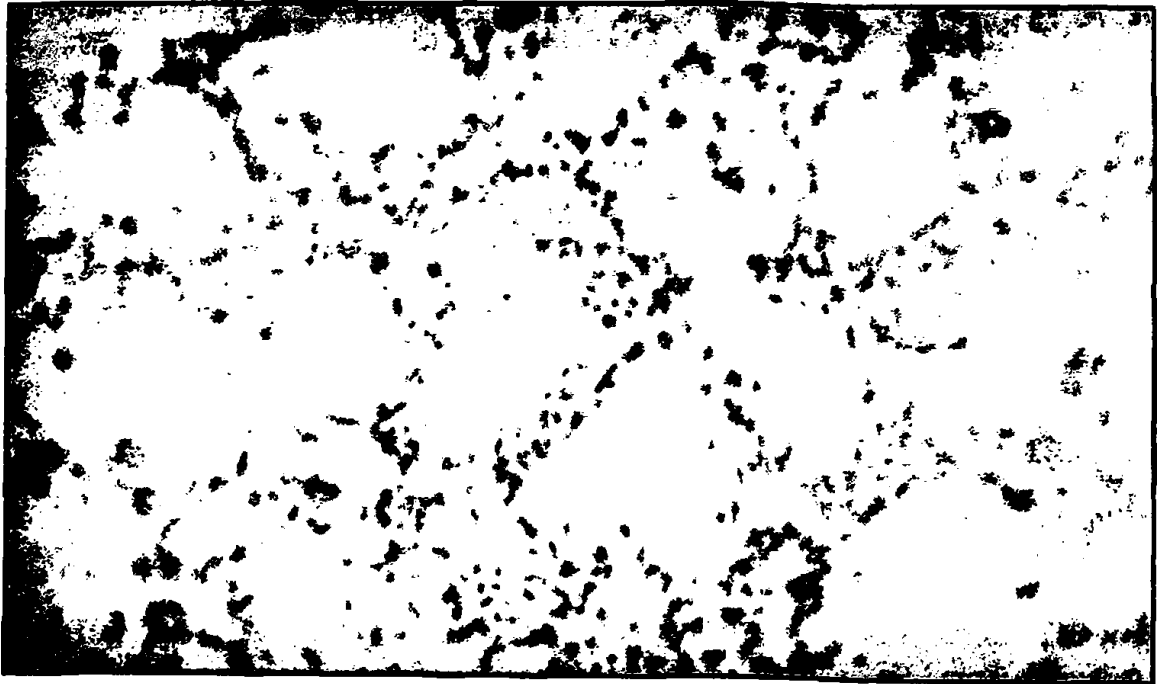
Σχήμα 1. Φυλογενετικό δέντρο της εξέλιξης των ειδών *Salmonella* μέσα σε πολύ σχετικές οικογένειες.

2. GRAM-ΑΡΝΗΤΙΚΑ, ΠΡΟΑΙΡΕΤΙΚΑ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ

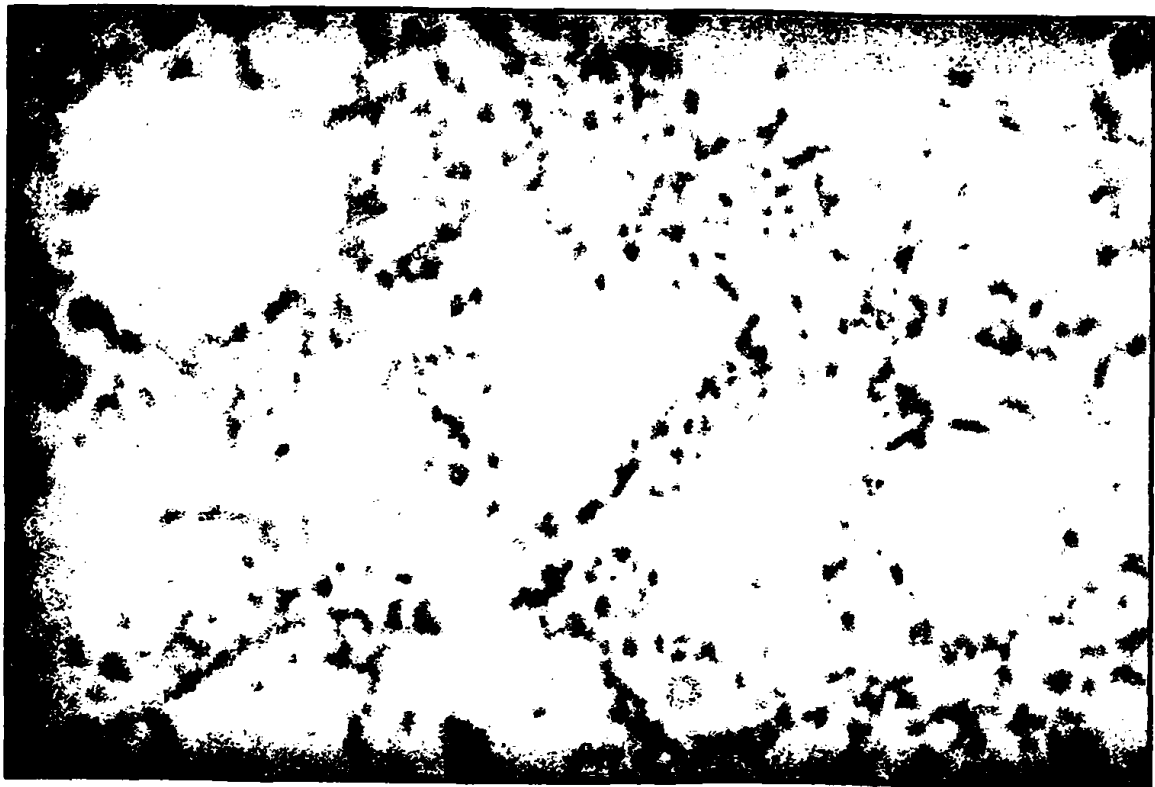
Στην ομάδα αυτή ανήκουν *Gram* αρνητικά βακτηρίδια τα οποία πολλαπλασιάζονται τόσο σε αερόβιες, όσο και προαιρετικά σε αναερόβιες συνθήκες. Είναι θετικά στη δοκιμή της καταλάσης εκτός από το είδος της *Shigella* και αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης. Όταν πολλαπλασιάζονται σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα παράγουν συνήθως αέριο. Υπάρχουν όμως και μη αεριογόνα στελέχη, όπως και μη αεριογόνα μεταλλαγμένα βακτηρίδια. Τα περισσότερα είδη είναι κινητά. Τα διάφορα είδη των βακτηριδίων της ομάδας αυτής, δεν είναι δυνατόν να διαχωριστούν μεταξύ τους μορφολογικά, εξαιτίας της μορφολογικής ομοιότητάς τους, με αποτέλεσμα ο καθορισμός του γένους και του είδους των βακτηριδίων της ομάδας αυτής να γίνεται σύμφωνα με τις βιοχημικές ιδιότητες τους. Ο καθορισμός του είδους *Salmonella spp* και *Escherichia coli*, που στα δύο αυτά γένη αποκαλείται



και θροτολος, ρυθίζεται στον ορολογικο καθορισμο των αντιγονικων συστατικων των βακτηριδιακων κυτταρων. Τα γενη της ομάδας αυτης, ανήκουν στις οικογένειες *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* και σε μια ομάδα γενών αβέβαιης συγγένειας (Holt, 1974).



Εικόνα 1. *Gram*-αρνητικά βακτηρίδια.



Εικόνα 2. *Gram*-αρνητικά βακτηρίδια.

2.1 Το γένος *Salmonella* - Ταξινόμηση

Ο Ebert και ο Koch τὸ 1880 απομόνωσαν το μικροοργανισμό που προκαλεί τον κοιλιακό τύφο του ανθρώπου. Το 1885 ο Salomon, από το όνομα του οποίου το γένος του μικροοργανισμού ονομάστηκε *Salmonella*, απομόνωσε τη *Salmonella cholerae-suis*.

Το γένος *Salmonella* έχει παγκόσμια εξάπλωση. Απομονώνεται στο έντερο των ζώων και του ανθρώπου, στα κόπρανα, στα ούρα, στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές. Η ονοματολογία των ειδών του γένους *Salmonella* είναι αμφισβητούμενη, δεδομένου ότι η αρχική ταξινόμια του γένους δεν βασίστηκε στη συγγένεια DNA, αλλά τα ονόματα δόθηκαν σύμφωνα με τις κλινικές εκτιμήσεις, π.χ., *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella abortus-ovis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella dublin*, *Salmonella bongor* ή την γεωγραφική θέση που η ασθένεια εμφανίστηκε. Έχουν περιγραφεί πολλοί ορότυποι του γένους *Salmonella*. Η οροτυπία κατά Kaufmann-White που βασίζεται στην παρουσία των O, H και V αντιγόνων, διέκρινε 100 διαφορετικούς ορότυπους το έτος 1941. Σήμερα αυτή η ταξινόμηση ανά ορότυπο διακρίνει 2463 ορότυπους (Kaufmann, 1966).

Τελικά διαπιστώθηκε ότι όλοι οι ορότυποι του γένους *Salmonella* αποτελούν μια ενιαία ομάδα υβριδοποίησης DNA, δηλαδή ένα ενιαίο είδος που αποτελείται από επτά υποείδη τα οποία έπειτα προσαρμόζονται. Για να αποφευχθεί η σύγχυση με τα γνωστά ονόματα των ορότυπων, το είδος *Salmonella enterica* προτάθηκε με τα ακόλουθα ονόματα για τα υποείδη: *enterica I*, *salamae II*, *houtenae IV*, *bongori B*, *diazarizonae IIIb*, *arizonae IIIa*, *Indica VI* (Holt, 1974).



Πίνακας 1.

Είδη *σαλμονέλων*, υποείδη, ορότυποι, και οι συνηθισμένοι βιότοποί τους, σχέδιο Kaufmann-White

Είδη και υποείδη <i>σαλμονέλων</i>	Αριθμός ορότυπων στα υποείδη	Συνηθισμένος βιότοπος
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> (I)	1454	Θερμόαιμα ζώα
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Salamae</i> (II)	489	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>Salmonella bongori</i> (V)	20	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
Total	2463	

2.2 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες

Στο γένος *Salmonella* ανήκουν αρνητικά κατά Gram βακτήρια, κινητά με περίτριχες βλεφαρίδες, αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια. Εξάιρεση αποτελούν οι *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* και *Salmonella dublin*, που παράγουν ειδικό ελυτροειδές περίβλημα και οι *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, που είναι ακίνητες (Τζώρα, 2002). Είναι χημειοαυτότροφα και έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν την τροφή τους, τόσο με την αναπνοή όσο και με τη ζύμωση. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται στην ευνοϊκή θερμοκρασία των 37°C. Η D-γλυκόζη και άλλοι υδρογονάνθρακες καταβολίζονται με τη παραγωγή οξέος και συχνά αερίου. Είναι αρνητικά βακτήρια στη δοκιμή της οξειδάσης και θετικά στην δοκιμή της καταλάσης, αρνητικά στις δοκιμές της ινδόλης και τη Voges-Proskauer και θετικά στις δοκιμές ερυθρού του μεθυλίου και της χρησιμοποίησης των κιτρικών



άλατων του Simmon (Holt, 1974). Παράγεται H₂S και δεν υδρολύουν την ουρία. Οι υδρογονάνθρακες που συνήθως ζυμώνονται είναι οι εξής:

- L- αραβινόζη
- μαλτόζη
- D-μανιτόλη
- D-μανόζη
- L- ραμνόζη
- D-σορβιτόλη
- D-ξυλόζη
- Τρεχαλόζη.

Οι υδρογονάνθρακες αυτοί φέρουν σημαντικά αντιγόνα που είναι συστατικά του κυττάρου και διακρίνονται στα σωματικά αντιγόνα (αντιγόνα O), βλεφαριδικά αντιγόνα (αντιγόνα H) και αντιγόνα κάψας (αντιγόνα K) (Moise, 1978).

➤ Σωματικά αντιγόνα (αντιγόνα O). Είναι λιποπολυσακχαρίτες και αποτελούν συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Τα αντιγόνα O είναι ανθεκτικά (2 ½ ώρες σε 100°C) και δεν καταστρέφονται από την αλκοόλη και τα οξέα. Αποτελούνται από διάφορα αντιγονικά συστατικά που χαρακτηρίζονται με αραβικούς αριθμούς. *Salmonella* με όμοιο αντιγόνο O, αλλά διαφορετικό αντιγόνο H, συμπεριλαμβάνονται στην ίδια οροομάδα, όπως η *Salmonella enteritidis* (αντιγόνο O= 1, 9, 12) και η *Salmonella gallinarum* (αντιγόνο O= 1, 9, 12) ανήκουν στην οροομάδα D. Στελέχη με ταυτόσημα αντιγόνα O και ταυτόσημα αντιγόνα H, θεωρούνται στελέχη του ίδιου ορότυπου ή του ίδιου είδους. Επομένως η *Salmonella enteritidis* και η *Salmonella gallinarum*, ανήκουν στην ίδια οροομάδα, αλλά σε διαφορετικούς ορότυπους.

➤ Βλεφαριδικά αντιγόνα (αντιγόνα H). Είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσεως, ευαίσθητες στη θερμότητα, στην αλκοόλη και στα οξέα. Τα βλεφαριδικά αντιγόνα κάθε *Salmonella* αποτελούνται από περισσότερα αντιγονικά συστατικά. Οι διάφοροι ορότυποι του γένους *Salmonella* έχουν διαφορετικό συνδυασμό αντιγονικών συστατικών, τα οποία σύμφωνα με το σχήμα Kauffmann-White χωρίζονται σε δύο είδη που ονομάζονται φάση 1 (ειδική φάση) και φάση 2 (μη ειδική φάση). Τα αντιγόνα που ανήκουν στη φάση 1, χαρακτηρίζονται με τα γράμματα του λατινικού αλφάβητου (a,b,c), ενώ τα αντιγόνα που ανήκουν στη



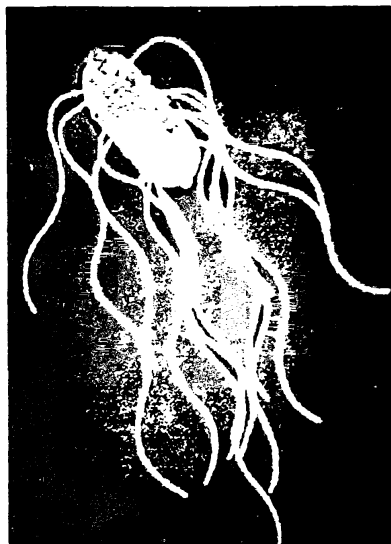
φάση 2, χαρακτηρίζονται με αραβικούς αριθμούς (1,2,3). Ένας ορότυπος σαλμονέλας είναι δυνατό να έχει αντιγόνα μόνο της μίας φάσης, όπως η *Salmonella enteritidis*, ή να έχει αντιγόνα και των δύο φάσεων, όπως η *Salmonella typhimurium* και η *Salmonella cholerae-suis*. Οι ακίνητες σαλμονέλες, *Salmonella gallinarum* και *Salmonella pullorum*, στερούνται βλεφαριδίων, επομένως δεν έχουν βλεφαριδικά αντιγόνα.

- Αντιγόνα κάψας (αντιγόνα K). Τα αντιγόνα αυτά παρατηρούνται μόνο στους παθογόνους για τον άνθρωπο ορότυπους *Salmonella typhi* και *Salmonella paratyphi*. Είναι αντιγόνα του βακτηριδιακού ελύτρου, πολυσακχαριδικής φύσεως. Εμποδίζουν τον προσδιορισμό του αντιγόνου O, επειδή περιβάλλουν το κυτταρικό τοίχωμα. Για το λόγο αυτό πριν από την ταυτοποίηση του αντιγόνου O πρέπει να προηγηθεί καταστροφή των αντιγόνων της κάψας με κατάλληλο τρόπο. Από τα περισσότερο γνωστά αντιγόνα του ελύτρου, είναι το αντιγόνο Vi (ονομασία που προέρχεται από τη λέξη Virulent =λοιμογόνος). Καταστρέφεται υπό την επίδραση της φαινόλης όταν θερμανθεί στους 60°C για μία ώρα. Τα είδη του γένους *Salmonella* που έχουν το αντιγόνο Vi θεωρούνται περισσότερο λοιμογόνα (Moise, 1978).

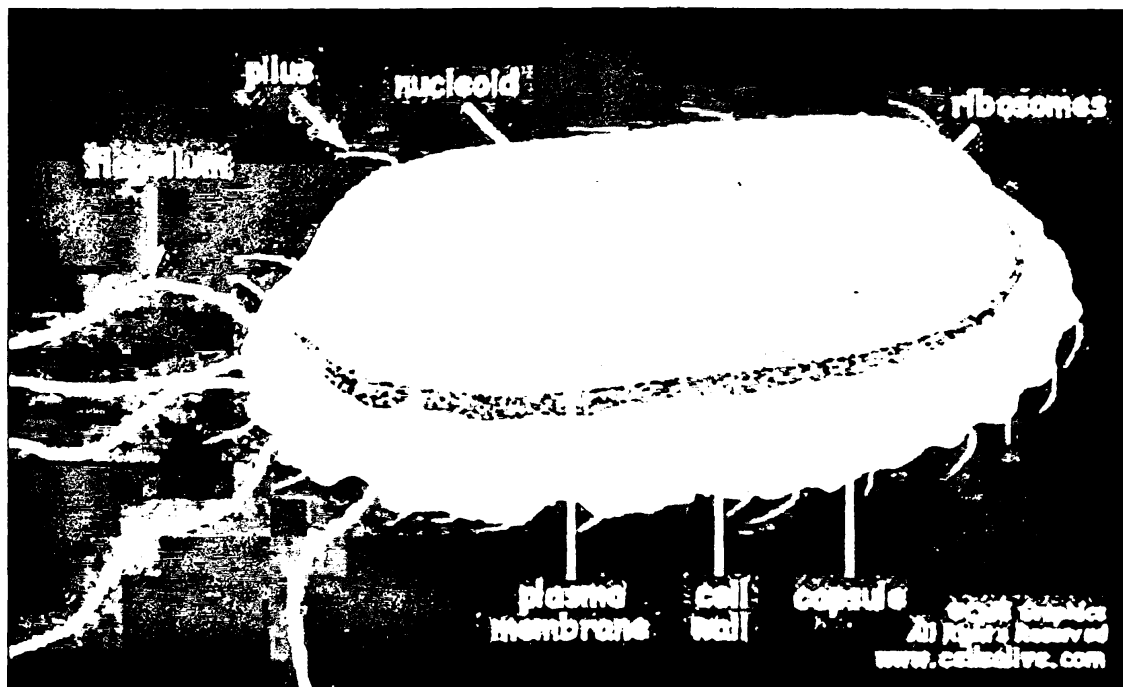
Στο γένος *Salmonella* η λεπτομερής ανάλυση των αντιγόνων O και H είχε σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση πολλών εκατοντάδων διαφορετικών ορότυπων. Η αντιγονική αυτή ταυτοποίηση αν και δεν έχει μεγάλη ταξινομική αξία είναι σημαντική από επιδημιολογική άποψη. Ο ορότυπος ενός παθογονικού στελέχους *Salmonella*, αποτελεί δείκτη αναγνώρισης του και έτσι γίνεται δυνατή η παρακολούθηση του μικροβίου σε περιπτώσεις μαζικών τροφικών δηλητηριάσεων. Με την βοήθεια ορισμένων βιοχημικών χαρακτηριστικών η *Salmonella* κατατάσσεται σε τέσσερις ομάδες και με βάση τα O και H αντιγόνα τους σε περίπου 2400 ορότυπους. Τα είδη του γένους *Salmonella* επίσης ταξινομούνται και σε διάφορους τύπους με βάση την ευαισθησία τους στους βακτηριοφάγους. Είναι εξαιρετικά ανθεκτικές και επιζούν ακόμη και όταν στερούνται των θρεπτικών συστατικών των απαραίτητων για το μεταβολισμό τους. Επιβιώνουν στην κατάψυξη. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανθεκτικότητα της *Salmonella* σε ορισμένες χρωστικές και χημικές ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων. Αναπτύσσονται σε pH 4-9 και σε άλμη πυκνότητας μέχρι 7 έως 8% NaCl. Όπως σε όλα τα Gram-αρνητικά βακτηρίδια, το κυτταρικό τοίχωμα των *Salmonella* περιέχει λιποπολυσακχαρίτες. Με



λύση των κυττάρων οι λιποπολυσακχαριτες ελευθερωνονται και ενεργουν ως οτοξίνες. Οι *Salmonella* δεν παράγουν εξωτοξίνες και ο μηχανισμός παθογένειας ης φαίνεται ότι έχει σχέση με το O αντιγόνο τους που δρα ως ενδοτοξίνη (Holt, 2000).



Εικόνες 3, 4. Μικρογραφία αναπαράστασης του βακτηρίου *Salmonella spp.*
(www.geocities.com, 2006).

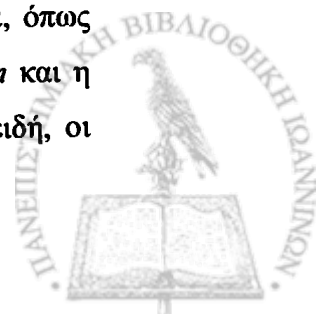


Εικόνα 5. Επίσης, μικρογραφία αναπαράστασης του βακτηρίου *Salmonella spp.*
(www.homepages.uel.ac.uk, 2006).

2.3 Παθογένεια

Οι μολύνσεις με τα βακτηρίδια του γένους *Salmonella* αποτελούν τον αιτιολογικό παράγοντα για ποικίλες οξείες και χρόνιες παθήσεις στα πτηνά. Τα πουλερικά και τα προϊόντα πουλερικών αποτελούν τη βασική αποθήκη του γένους *Salmonella* και αναφέρονται ως η σημαντικότερη πηγή μόλυνσης *Salmonella*. Οι πτηνοτρόφοι βρίσκονται αντιμέτωποι με τις αυξανόμενες πιέσεις από τις αρχές δημόσιας υγείας και τους καταναλωτές σχετικά με τα ζητήματα ασφάλειας τροφίμων. Η απομόνωση των *Salmonella* αναφέρεται συχνότερα στα πουλερικά και στα ζωικά προϊόντα αυτών από ότι σε οποιαδήποτε άλλη ζωική πηγή. Αυτό το αποτέλεσμα οφείλεται εν μέρει στην υψηλή επικράτηση των μολύνσεων των *Salmonella* στα πουλερικά, αλλά απεικονίζει και την εμπορικότητα του πουλερικού και της γαλοπούλας ως ζωικό τρόφιμο, άρα και την επιθυμία για εφαρμογή ενεργών διαγνωστικών προγραμμάτων για τα μολυσμένα σμήνη και τα προϊόντα πουλερικών σε πολλές χώρες. Το όλο και μεγαλύτερο διεθνές πεδίο της σύγχρονης βιομηχανίας προϊόντων πουλερικών έχει δημιουργήσει νέες και πιο σύνθετες ευκαιρίες για τη διάδοση του γένους *Salmonella* (Vassos, 2004).

Οι περισσότερες *Salmonella* είναι παθογόνες για τα ζώα και τα πτηνά. Η σαλμονέλωση θεωρείται ζωνοσός διότι η ανθρώπινη ασθένεια επέρχεται από τα μολυσμένα ζώα. Η μετάδοση γίνεται από την απεκκριτική και τη στοματική οδό. Τα ζώα που προσβάλλονται είναι τα πτηνά, οι χοίροι, τα βοοειδή, τα πρόβατα, τα άλογα, τρωκτικά, όλα τα κατοικίδια (από σκύλους μέχρι χελώνες και παπαγάλους) και πολλά άλλα. Στις όρνιθες η *Salmonella gallinarum* προκαλεί τον τύφο των ορνίθων και τη λευκή διάρροια των νεοσσών, ενώ η *Salmonella pullorum* προκαλεί κυρίως τη λευκή διάρροια των νεοσσών. Στις πάπιες, ιδιαίτερα στους νεοσσούς, η *Salmonella typhimurium* και κατά δεύτερο λόγο η *Salmonella enteritidis*, προκαλούν σηψαιμία και διάρροια. Στα περιστέρια σχεδόν αποκλειστικά η *Salmonella typhimurium variatio copenhagen*, προκαλεί σηψαιμία ή χρόνια σαλμονέλωση με κλινικά συμπτώματα εντερίτιδας και αρθρίτιδας. Χαρακτηριστικό κλινικό σύμπτωμα είναι η αρθρίτιδα στον αγκώνα, που εμφανίζεται με διόγκωση και τυρώδες περιεχόμενο η οποία αποκαλείται χαρακτηριστικά «κόμπος στο φτερό». Στο χοίρο, η *Salmonellacholerae-suis* προκαλεί χρόνιο ή οξύ σηψαιμικής μορφής νόσημα, ή εντοπίζεται σε ορισμένα όργανα, προκαλώντας έκδηλα κλινικά συμπτώματα, όπως διάρροια, βήχα, χωλότητα και απίσχναση. Επίσης η *Salmonella typhimurium* και η *Salmonella typhi-suis*, συχνά προκαλούν διάρροια στους χοίρους. Στα βοοειδή, οι



Salmonella typhimurium, η *Salmonella dublin* και η *Salmonella enteritidis* προκαλούν εντερίτιδες, σηψαιμίες και αρθρίτιδες. Η *Salmonella abortus-bovis* προκαλεί αποβολές στις αγελάδες. Στο πρόβατο, η *Salmonella typhimurium* και η *Salmonella dublin*, σε ορισμένες περιπτώσεις προκαλούν εντερίτιδες, ενώ η *Salmonella abortus-onis* προκαλεί αποβολές, οι οποίες στη χώρα μας, αποτελούν πρόβλημα στην προβατοτροφία. Στο άλογο, η *Salmonella abortus- equi* προκαλεί αποβολές στις φορβάδες, ενώ στους πώλους σηψαιμία και απίσχναση. Η *Salmonella typhimurium* είναι σε θέση να προκαλέσει αποβολές στις φορβάδες, ωστόσο προκαλεί συχνότερα εντερίτιδες (Σκούφος, 2002).

Τα φίδια, οι σαύρες και κυρίως οι χελώνες έχουν αναχθεί τα τελευταία χρόνια σε σημαντική πηγή μόλυνσης από *Salmonella* για τον άνθρωπο. Σύμφωνα με έρευνες το 13% των περιπτώσεων σαλμονέλωσης που εντοπίστηκαν το 1996 στη Σουηδία σχετίζονται με ερπετά. Στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι ποσοστό 3% των νοικοκυρών διαθέτει ένα ερπετό. Η σαλμονέλωση εμφανίζεται μετά από άμεση ή από έμμεση επαφή με τα περιττώματα των ερπετών. Τα κρούσματα σαλμονέλωσης στις περιπτώσεις αυτές είναι αυξημένα στα παιδιά μικρής ηλικίας, επειδή αυτά έρχονται συχνότερα σε επαφή με τα κατοικίδια ερπετά και παράλληλα δεν έχουν αναπτύξει επαρκώς το ανοσοποιητικό τους σύστημα. Η μετάδοση της του γένους *Salmonella* απευθείας από ζώο σε ζώο είναι εύκολη, εξαιτίας της μαζικής τους παραμονής σε συγκεκριμένους χώρους και της ομαδικής τους διακίνησης. Σημαντική είναι ακόμη και η συμβολή των μολυσμένων ζωοτροφών στην μετάδοση της νόσου στα ζώα (Vassos, 2004).



Πίνακας 2.

Ασθένειες από συγκεκριμένα είδη του γένους *Salmonella spp* σε ζωικά είδη

Είδος ζώου	Είδος <i>Salmonella</i>	Ασθένειες
Όρνιθες	<i>Salmonella gallinarum</i>	Τύφος των ορνίθων - Λευκή διάρροια των νεοσσών
	<i>Salmonella pullorum</i>	Λευκή διάρροια των νεοσσών
Πάπιες	<i>Salmonella typhimurium</i>	Σηψαιμία και διάρροια(νεοσσούς)
	<i>Salmonella enteritidis</i>	Σηψαιμία και διάρροια (νεοσσούς)
Περιστερία	<i>Salmonella typhimurium variatio Copenhagen</i>	Σηψαιμία ή χρόνια σαλμονέλωση με κλινικά συμπτώματα εντερίτιδας και αρθρίτιδας
Χοιρινά	<i>Salmonellacholerae-suis</i>	Χρόνιο ή οξύ σηψαιμικής μορφής νόσημα, διάρροια, βήχας, χωλότητα και απίσχναση
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Διάρροια στους χοίρους
	<i>Salmonella typhisuis</i>	Διάρροια στους χοίρους
Βοοειδή	<i>Salmonella typhimurium</i>	Εντερίτιδες,σηψαιμίες και αρθρίτιδες
	<i>Salmonellaenteritidis</i>	Εντερίτιδες, σηψαιμίες και αρθρίτιδες
	<i>Salmonelladublin</i>	Εντερίτιδες, σηψαιμίες και αρθρίτιδες
	<i>Salmonellaabortus-bovis</i>	Αποβολές στις αγελάδες
Πρόβατα	<i>Salmonella typhimurium</i>	Εντερίτιδες
	<i>Salmonelladublin</i>	Εντερίτιδες
	<i>Salmonellaabortus-ovis</i>	Αποβολές
Άλογα	<i>Salmonellaabortus-equi</i>	Αποβολές στις φορβάδες, ενώ στους πώλους σηψαιμία και απίσχναση
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Αποβολές στις φορβάδες, εντερίτιδες

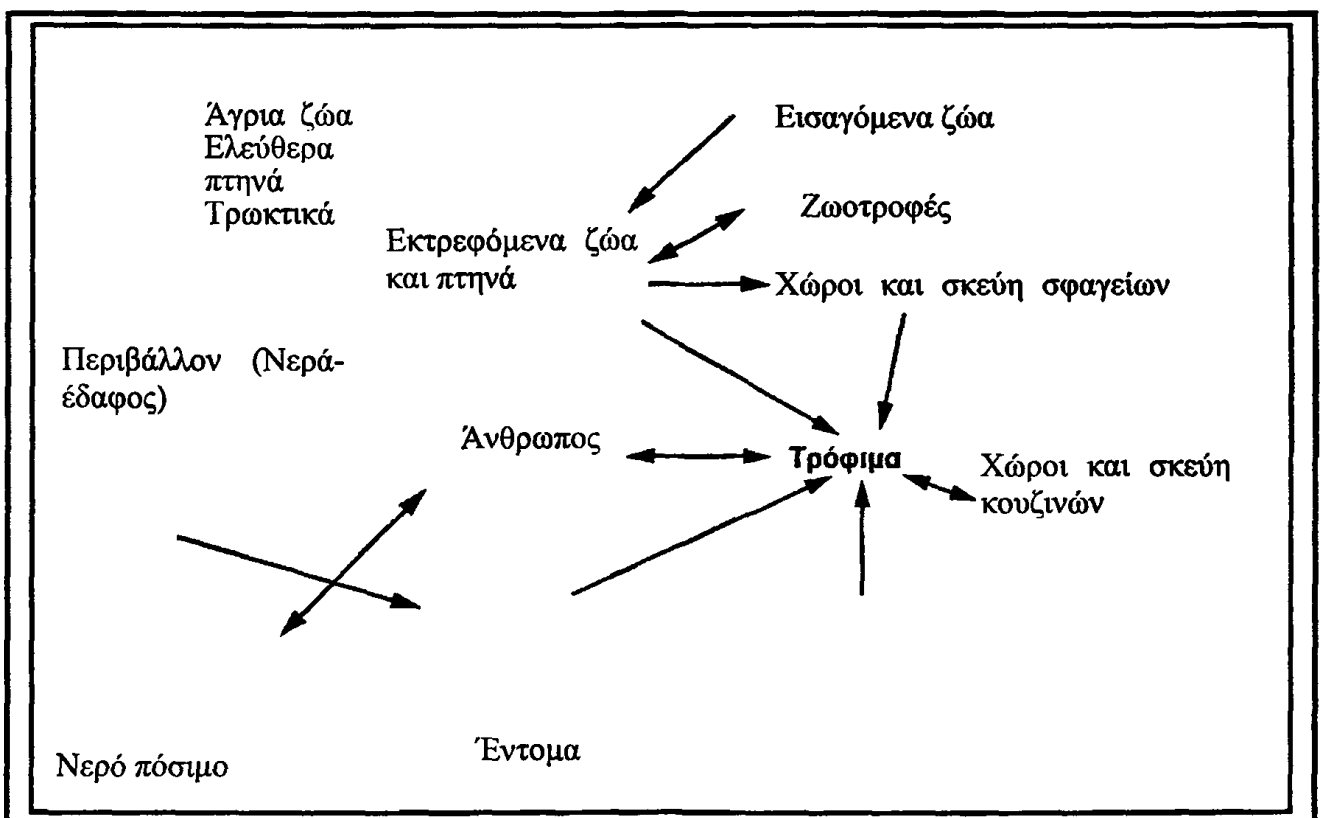
Σκούφος, 2002



Η τροφογενής μετάδοση του γένους *Salmonella* στον άνθρωπο επιτυγχάνεται με την κατανάλωση τροφίμων. Το κρέας, το γάλα και τα αυγά είναι η κυρίως παρακαταθήκη όταν είναι ατελώς μαγειρευμένα ή όταν μολύνονται μετά το μαγείρεμα. Τα τρόφιμα μπορούν να μολυνθούν με:

- τα κόπρανα των ζώων.
- τα χέρια ατόμων φορέων που ασχολούνται με την επεξεργασία των τροφίμων.
- την επαφή τους με μολυσμένα εργαλεία και σκεύη.
- μολυσμένα ζώα ή κτηνοτροφικά προϊόντα (π.χ. αυγά).

Σχήμα 2. Διάγραμμα μετάδοσης των *Salmonella* (Doyle et al., 2001).



2.4 Πηγές μόλυνσης

Οι πηγές μόλυνσης με *Salmonella* για τα πτηνά είναι πολυάριθμες. Τα πουλερικά και πολλά άλλα ζώα είναι συχνά φορείς, συχνότερα μολυσμένα και πιο σπάνια κλινικά άρρωστα, τα οποία μπορούν να εκκρίνουν *Salmonella* με τα περιττώματά τους και να διαμορφώσουν μια μεγάλη δεξαμενή και μια πηγή μόλυνσης για άλλα ζώα, τους ανθρώπους και το περιβάλλον (Kaufmann, 1966). Τα πουλερικά μολύνονται συχνά μέσω της οριζόντιας μετάδοσης από τα απορρίμματα, τα περιττώματα, την τροφή, το νερό, το χνούδι, τη σκόνη, τα ξύσματα, το άχυρο, τα έντομα, τον εξοπλισμό και άλλα και από την επαφή με άλλους νεοσσούς ή κοτόπουλα, τρωκτικά, κατοικίδια ζώα, άγρια πουλιά, οικόσιτα και άγρια ζώα και με το προσωπικό. Η κάθετη μετάδοση εμφανίζεται όταν μολύνονται τα ωοθυλάκια ή όταν τα αναπτυσσόμενα αυγά μολύνονται στον ωαγωγό. Τα πρωτόκολλα διαχείρισης μιας πτηνοτροφικής μονάδας μπορούν να έχουν μια σημαντική επιρροή στο βαθμό μετάδοσης της *Salmonella*. Πολλοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν την οριζόντια και κάθετη μετάδοση είναι αλληλένδετοι (Vassos, 2004).

2.4.1 Μέτρα προφύλαξης από την μόλυνση

Τα μέτρα που προτείνονται για τον περιορισμό της παρουσίας του γένους *Salmonella* και την αποφυγή των τροφολοιμώξεων είναι πολλαπλά. Αυτά εκτείνονται από ελέγχους των Κρατικών Υπηρεσιών και Προγράμματα σε Εθνικό και Διεθνές Επίπεδο με ρεαλιστικά κριτήρια και ανάλυση στατιστικών δεδομένων, μέχρι απλές ενέργειες που πρέπει να έχει υπόψη του ο κάθε άνθρωπος. Έτσι διακρίνουμε τα παρακάτω ζωοτεχνικά μέτρα:

- Εκπόνηση Προγραμμάτων σε Εθνικό Επίπεδο πρόληψης της μετάδοσης της *Salmonella* στα ζώα και στα πτηνά. Συγκεκριμένα η εκρίζωση των παθογόνων για τα πουλερικά *Salmonella gallinarum* και *Salmonella pullorum* που αποτελούσαν το κύριο πρόβλημα της εντατικοποιημένης πτηνοτροφίας στις ανεπτυγμένες χώρες, επιτεύχθηκε εν μέρει με ένα συντονισμένο πρόγραμμα υγειονομικών μέτρων, με ταυτόχρονο έλεγχο τιτλοποίησης αντισωμάτων και θανάτωση των μολυσμένων πατρογονικών σμηνών. Στη χώρα μας, παρά το ότι η μείωση των κρουσμάτων είναι σημαντική, η συχνότητα των υπεύθυνων οροτύπων *Salmonella* παραμένει υψηλή συγκριτικά με άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Τα πατρογονικά σμήνη των



πουλερικών και τα εκκολαπτήρια αποτελούν τα πιο σημαντικά σημεία ελέγχου για την πρόληψη των σαλμονελώσεων στα πτηνά.

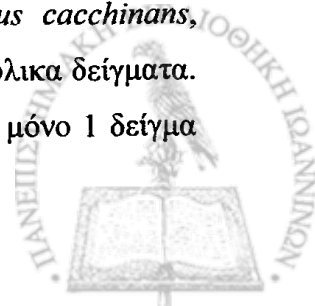
- Παραγωγή ζώων ελεύθερων από ειδικά παθογόνα μικρόβια, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και η *Salmonella* (specific pathogen free).
- Αντιμετώπιση των ασθενειών με χρήση κατάλληλων φαρμάκων.
- Προληπτική υγιεινή των ζώων και των πτηνών και του περιβάλλοντος στους στάβλους και τις φάρμες.
- Έλεγχος των ζωοτροφών.
- Εκπαίδευση του προσωπικού των σταβλικών εγκαταστάσεων.
- Αποτελεσματικός έλεγχος πριν την σφαγή των ζώων και των πτηνών.
- Πληροφοριακή σύνδεση των ευρημάτων των σφαγείων με όλο το κύκλωμα παραγωγής και διακίνησης του κρέατος (Εθνικό και Διεθνές Επίπεδο).

3. Κατανομή του γένους *Salmonella* spp στα άγρια πτηνά και ζώα.

Τα βακτηρίδια του γένους *Salmonella* βρίσκονται στα περιττώματα των άρρωστων πτηνών και διαδίδονται από πτηνό σε πτηνό κατά την αναπαραγωγική τους κυρίως περίοδο, και μολύνουν με τα περιττώματα τα υγιή. Η ασθένεια εμφανίζεται συχνότερα κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών όταν τα πτηνά συγκεντρώνονται σε μεγάλα σμήνη (Arvanitidou, 1997).

Το εντεροπαθογόνο βακτηρίδιο *Salmonella* spp, είναι υπεύθυνο για περίπου 5000 αναφερθείσες περιπτώσεις ανθρώπινης γαστρεντερίτιδας κάθε έτος στη Σουηδία. Η σαλμονέλωση είναι μια μεταδοτική ασθένεια έχοντας ως φορέα τα μολυσμένα ζώα, και το βακτηρίδιο έχει τη δυνατότητα να μολύνει ποικιλία από οικόσιτα και άγρια ζωικά είδη (http://www.umu.se/cm/f/6_Avhandlingar/Palmgren_abstract.htm).

Οι γλάροι αποτελούν μια σημαντική πηγή μόλυνσης με *Salmonella* για τους ανθρώπους και το ζωικό κεφάλαιο. Ο Fenlon, στην Σκωτία μετά από έρευνα σε 1242 δείγματα περιττωμάτων, προερχόμενων από γλάρους, βρήκε μόλυνση από *Salmonella* σε ποσοστό 12,9%. Έπισης, διαπίστωσε ότι ο αριθμός θετικών δειγμάτων ήταν σημαντικά υψηλότερος (17-21%) κοντά στις εκβολές λυμάτων. Ο Snoeyenbos και οι συνεργάτες του, στη Μασαχουσέτη εξέτασαν ασημόγλους (*Larus cacchianus*, Pallas) και βρήκαν 10 θετικά δείγματα σε *Salmonella* από τα 405 συλλογικά δείγματα. Επίσης, εξέτασαν τα αυγά γλάρων και βρέθηκε θετικό σε *Salmonella* μόνο 1 δείγμα



από τα 80 που εξετάστηκαν. Πολλές έρευνες για τους γλάρους έχουν πραγματοποιηθεί στην Ευρώπη και ειδικά για τον καστανοκεφαλόγλαρο (*Larus ridibundus*). Ο Selbitz στη Γερμανία, διαπίστωσε ότι βρέθηκαν 42 θετικά δείγματα από τα 852 που εξετάστηκαν (4,9%) (Tizard, 2004, <http://www.eppkas.gr/poulia.htm>, 2006).

Βρέθηκε από ερευνητές στην Αγγλία, ότι το ποσοστό των πτηνών, θετικών σε *Salmonella* ήταν πολύ υψηλότερο στους νεαρούς γλάρους του πρώτου έτους (9,7%) απ' ότι στα πουλιά τεσσάρων ετών (2%) και αυτό οφειλόταν στους υψηλότερους πληθυσμούς νεαρότερων πουλιών που ταιζότανε κατά μήκος της ακτής (Tizard, 2004).

Στις μελέτες των άγριων πληθυσμών πτηνών στη Σουηδία, διαπιστώθηκε ότι ο καστανοκεφαλόγλαρος μπορεί να είναι ο κύριος ξενιστής για τις *Salmonella* στα πτηνά, και ότι η μόλυνση από *Salmonella* εκφράζεται ως μεταφορά χωρίς τις προφανείς εκδηλώσεις της ασθένειας. Ο καστανοκεφαλόγλαρος είναι ένα μεταναστευτικό πουλί και μπορεί να μεταφέρει είδη *Salmonella* με τα γνωρίσματα οξύτητας όπως την αντιβιοτική αντίσταση, από πηγές έξω από τη Σουηδία. Οι γενετικές μοριακές μέθοδοι, PFGE και IS200, επίσης καταδεικνύουν ότι ο καστανοκεφαλόγλαρος διαδραματίζει βασικό ρόλο στην αλυσίδα μετάδοσης της *Salmonella* μέσα στα σύνορα της Σουηδίας (http://www.umu.se/cm/f/6_Avhandlingar/Palmgren_abstract.htm).

Στην Αμερική και συγκεκριμένα τον Καναδά, τα υδρόβια πτηνά δημιουργούν προβλήματα από *Salmonella* ειδικά όταν συναθροίζονται σε μεγάλους αριθμούς κατά την διάρκεια του χειμώνα σε πάρκα. Εντούτοις, τα υδρόβια πουλιά δεν μολύνουν με τον τρόπο και τον ρυθμό που μολύνουν οι γλάροι. Αφ' ετέρου, τα υδρόβια πουλιά που ζουν στα μολυσμένα ύδατα μπορούν να μολυνθούν με *Salmonella*. Οι Mitchell και Ridgwell εξέτασαν 477 δείγματα περιτωμάτων παπιών από μια δεξαμενή στο Λονδίνο κατά τη διάρκεια των χειμώνων του 1969 και 1970 και διαπίστωσαν ότι 4,11% περιείχε *Salmonella*. Τα είδη παπιών που εξετάστηκαν περιελάμβαναν την Κυνηγόπαπια (*Aythya ferina*), την Πρασινοκέφαλη (*Anas platyrhynchos*), το Κικίρι (*Anas crecca*) και την Τσικνόπαπια (*Aythya fuligula*) (Tizard, 2004).

Σε μια μελέτη του πληθυσμού γερακιών πετριτών στην Σουηδία και στην Βόρεια Αμερική, βρέθηκαν είδη *Salmonella amager* και *Campylobacter jejuni*. Υπήρξαν ενδείξεις, βασισμένες στην οροτυπική ταξινόμηση των *Salmonella* και τη γενετική δακτυλογράφηση από το PFGE του είδους *Campylobacter*, ότι αυτές οι απομονώσεις μεταδόθηκαν στα γεράκια από άνθρωπο φορέα ή κάποιο κατοικίδιο



ζώο. Αυτό το αρπακτικό πουλί που έχει σποραδική επαφή με τους ανθρώπους μπορεί να μολυνθεί από είδη *Salmonella* ανθρώπινης προέλευσης και να ταΐσει και άλλα πουλιά, όπως το γλάρο (http://www.umu.se/cm/f/6_Avhandlingar/Palmgren_abstract.htm, Tizard, 2004).

Επίσης, τα νυκτερινά αρπακτικά πτηνά όπως οι κουκουβάγιες μπορούν να αποκτήσουν τη μόλυνση κατ'αυτό τον τρόπο. Κατά συνέπεια, Kirkpatrick και Colvin, επίσης σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο Νιου Τζέρσεϋ, βρήκαν 8 θετικά δείγματα από τα 94 (8,5%) των κουκουβαγιών σιταποθηκών (*Tyto alba*). Επιπλέον, ο Asagi και οι συνάδελφοι απομόνωσαν 2 θετικά δείγματα από τα 30 δείγματα υγιών κοράκων στην Ιαπωνία. Στα Κορακοειδή ανήκουν κυρίως η Κάργια (*Corvus monedula*), το Χαβαρόνι (*Corvus frugilegus*), η Καρακάζα (*Pica pica*), η Κίσσα (*Garrulus glandarius*), (<http://www.eppkas.gr/poulia.htm>, 2006). Μόλις μολυνθούν, οι κίσσες και οι κόρακες με *Salmonella* μολύνουν στην συνέχεια και άλλα είδη πτηνών και ζώων με τα περιττώματά τους (Tizard, 2004).

Η *Salmonella* απομονώθηκε στους πγκουΐνους, στα άλμπατρος και κυρίως στις φώκιες σε μια μελέτη της περιοχής της Ανταρκτικής. Διάφορα χαρακτηριστικά γνωρίσματα ορότυπων του γένους *Salmonella* αποδεικνύουν την ανθρώπινη προέλευση και επίσης μια διαζωνική μετάδοση του γένους *Salmonella* στα διάφορα ζωικά είδη στην Ανταρκτική (Σαλέπη, 2005).

4. Βιοχημικές ιδιότητες- Απομόνωση και ταυτοποίηση σαλμονέλων

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί μέθοδος που να είναι αρκετά ευαίσθητη ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση όλων των ορότυπων του γένους *Salmonella* από τα διάφορα είδη τροφίμων ή από όργανα ή από στοιχεία του περιβάλλοντος. Ανεξάρτητα όμως από τη γενική αυτή διαπίστωση και τις επιμέρους διαφορές στις τεχνικές και τα υποστρώματα, η μεθοδολογία που εφαρμόζεται σήμερα για την αναζήτηση των σαλμονέλων στα διάφορα δείγματα περιλαμβάνει δύο στάδια (Thatcher & Clark, 1968):

1. Στο πρώτο στάδιο γίνεται η απομόνωση των βακτηριδίων με τη χρησιμοποίηση :

- Υγρών μη εκλεκτικών εμπλουτιστικών υποστρωμάτων.
- Υγρών εκλεκτικών εμπλουτιστικών υποστρωμάτων.
- Στερεών εκλεκτικών υποστρωμάτων.



Τα εμπλουτιστικά μη εκλεκτικά υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιούνται σκοπίμως δεν περιέχουν ανασταλτικούς παράγοντες για την ανάπτυξη οποιουδήποτε βακτηρίου. Τα υποστρώματα αυτά βοηθούν τα βακτήρια να ανανήψουν από μια κατάσταση τραυματισμού ή φυσιολογικής αδράνειας με την οποία υφίστανται σε τρόφιμα τα οποία υπέστησαν θερμική κατεργασία, αποξήρανση, αφυδάτωση, κατάψυξη, επίδραση εξιονιζουσών ακτινοβολιών, περιέχουν συντηρητικά, έχουν χαμηλό pH ή μεγάλη οσμωτική πίεση.

Έτσι τα μη εκλεκτικά εμπλουτιστικά υποστρώματα βοηθούν τα βακτήρια να ξεπεράσουν την κατάσταση του τραυματισμού ή της φυσιολογικής τους αδράνειας προτού υποστούν την επίδραση των τοξικών παραγόντων που είναι ενσωματωμένοι στα εκλεκτικά εμπλουτιστικά υποστρώματα και οι οποίοι θα μπορούσαν να αποβούν καταστρεπτικοί για μικροβιακά κύτταρα μειωμένης αντιστάσεως.

Είναι ζωτικής σημασίας να ρυθμιστεί το pH των υποστρωμάτων αυτών εκ νέου στο άριστο για την ανάπτυξη του γένους *Salmonella*, μετά την προσθήκη του δείγματος-ενοφθαλμίσματος.

Τα εκλεκτικά εμπλουτιστικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται για να ευνοήσουν τον πολλαπλασιασμό των σαλμονέλων σε βάρος άλλων βακτηριδίων όπως του γένους *Colibacillus*, *Proteus* και *Pseudomonas* τα οποία συνήθως υπερκαλύπτουν τις *Salmonella*, ιδίως όταν βρίσκονται σε μεγαλύτερο αρχικό πληθυσμό μέσα στα δείγματα.

Τέλος τα στερεά εκλεκτικά υποστρώματα περιέχουν εκλεκτικούς παράγοντες οι οποίοι δρουν με τον τρόπο που περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο, καθώς και δείκτες που μας επιτρέπουν να διαχωρίσουμε τις αποικίες που κατά τεκμήριο προέρχονται από τις *Salmonella*.

2. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η ταυτοποίηση των βακτηριδίων που απομονώθηκαν με τη χρησιμοποίηση:

- Βιοχημικών δοκιμών.
- Χρήση πολυδύναμων αντι-Ο και αντι-Η όρων.
- Χρήση μονοδύναμων αντι-Ο και αντι-Η και αντι-Vi όρων.
- Χρήση βακτηριοφάγων σε ορισμένες περιπτώσεις.



4.1 Απομόνωση του γένους *Salmonella* (Fda, 1976)

4.1.1 Φάση μη εκλεκτικού εμπλουτισμού (προεμπλουτιστική)

A. Μέθοδος για κρέατα, ζωικές ουσίες και ιχθυάλευρα.

1) Προϊόντα που υπέστησαν θερμική κατεργασία ή αφυδάτωση:

- Ζυγίζονται ασήπτως 25 g δείγματος σε ειδική φιάλη ομογενοποίησης.
- Προσθέτονται 225 ml Buffered Peptone Water ή Trypticase Soy Yeast Extract Broth ή Nutrient Broth και ακολουθεί ομογενοποίηση για 2 min στις 8000 rpm σε ηλεκτρικό ομογενοποιητή.
- Μεταφορά σε ευρύστομη αποστειρωμένη φιάλη.
- Έλεγχος του pH με τη βοήθεια ειδικής ταινίας και εφόσον είναι χαμηλότερο από 6,6 ρυθμίζεται σε $6,8 \pm 0,1$ με τη βοήθεια στείρου διαλύματος N NaOH.
- Προσθήκη 2,2 ml Tergitol Anionic 7 (που παρέμεινε για 15 min σε ατμό) ή στείρου Triton X-100, για την γαλακτωματοποίηση των λιπών.
- Επώαση στους 35°C για 24 ± 2 ώρες.
- Η μέθοδος συνεχίζεται όπως περιγράφεται παρακάτω με τη φάση του εκλεκτικού εμπλουτισμού και τη φάση της απομόνωσης.

2) Νωπά ή μολυσμένα προϊόντα:

- Ζυγίζονται 25 g δείγματος σε δύο ειδικές αποστειρωμένες φιάλες ομογενοποίησης.
- Προσθέτονται 225 ml Selenite Cystine Broth στη μία και 225 ml Moeller-Kauffman Tetrathionate Broth στην άλλη και ακολουθεί ομογενοποίηση για 2 min σε 8000 rpm σε ηλεκτρικό ομογενοποιητή.
- Μεταφορά σε ευρύστομη φιάλη των 500 ml.
- Επώαση στους 35°C για 24 ± 2 ώρες.
- Η μέθοδος συνεχίζεται όπως περιγράφεται παρακάτω με τη φάση του εκλεκτικού εμπλουτισμού και τη φάση της απομόνωσης.



B. Μέθοδος για πλήρη αυγά σε σκόνη, κρόκους αυγών σε σκόνη, λεύκωμα αυγών σε σκόνη, παστεριωμένα αυγά, παστεριωμένα κατεψυγμένα αυγά, έτοιμα μίγματα.

- Εφόσον το προϊόν είναι κατεψυγμένο γίνεται γρήγορη απόψυξη στους 45°C για 15 min ή καλύτερα στους 5-10°C.
- Ζυγίζονται ασήπτως 25 g δείγματος σε μια ευρύστομη αποστειρωμένη φιάλη με βιδωτό πώμα.
- Προσθέτονται 225 ml Buffered Peptone Water ή Trypticase Soy Yeast Extract Broth ή Nutrient Broth ή Lactose Broth. Εάν το προϊόν είναι σε μορφή σκόνης τότε προσθέτουμε τμηματικά το ζωμό και η ομογενοποίηση γίνεται με τη βοήθεια στείρας ράβδου ή σπάτουλας.
- Η φιάλη παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min.
- Αναταράσσεται η φιάλη, ελέγχεται το pH με τη βοήθεια ταινίας και εάν χρειάζεται ρυθμίζεται στο $6,8 \pm 0,1$ με τη βοήθεια αποστειρωμένου διαλύματος N NaOH ή N HCl.
- Χαλαρώνεται το πώμα της φιάλης και επωάζεται στους 35°C για 24 ± 2 ώρες.
- Η μέθοδος συνεχίζεται όπως περιγράφεται παρακάτω με τη φάση του εκλεκτικού εμπλουτισμού και τη φάση της απομόνωσης.

Γ. Μέθοδος για πλήρες γάλα σε σκόνη και αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη.

- Ζυγίζονται ασήπτως 25 g δείγματος σε μια αποστειρωμένη φιάλη.
- Προσθέτονται 250 ml αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού και ομογενοποιείται πολύ καλά το περιεχόμενο της φιάλης.
- Ελέγχεται με ειδική ταινία το pH και εφόσον είναι χαμηλότερο από 6,6 ρυθμίζεται στο $6,8 \pm 0,2$ με αποστειρωμένο διάλυμα N NaOH.
- Προσθέτονται 0,5 ml υδατικού διαλύματος Brilliant green 1% και ομογενοποιείται καλά το περιεχόμενο της φιάλης.
- Επώαση στους 35°C για 24 ± 2 ώρες.
- Η μέθοδος συνεχίζεται όπως περιγράφεται παρακάτω με τη φάση του εκλεκτικού εμπλουτισμού και τη φάση της απομόνωσης.



4.1.2 Φάση εκλεκτικού εμπλουτισμού

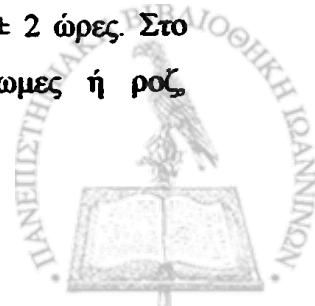
Από τις καλλιέργειες της φάσης του μη εκλεκτικού εμπλουτισμού και αφού ομογενοποιηθεί καλά το περιεχόμενό τους, μεταφέρονται 10 ml σε 100 ml, ή 1 ml σε 10 ml εμπλουτιστικού υποστρώματος Selenite Cystine Broth. Επίσης μεταφέρονται 10 ml σε 100 ml, ή 1 ml σε 10 ml εμπλουτιστικού υποστρώματος Moeller- Kauffman Tetrathionate Broth. Η επώαση γίνεται στους 35°C για 24 ± 2 ώρες.

Σημείωση:

- Τα υποστρώματα μετά το ψυγείο κατά τη χρήση τους, πρέπει να μπουν για 1-3 ώρες στους 30°C στον ξηραντήρα (για να φύγει η επιφανειακή υγρασία που περιέχουν τα βάζουμε μισάνοιχτα). Το S-S Agar μετά τη δημιουργία του το αφήνουμε στο περιβάλλον για 3-6 ώρες και μετά τοποθετείται στο ψυγείο (αλλιώς θα δημιουργηθούν υδρατμοί).
- Ορισμένα εργαστήρια όταν χρησιμοποιούν δύο εμπλουτιστικούς ζωμούς, προτιμούν να επωάζουν το ζωμό Tetrathionate στους 43°C για 18-24 ώρες και το ζωμό Selenite Cystine στους 35°C ή 37°C για 18-24 ώρες (Vassiliadis et al, 1970, Vogiazas, 1977).
- Για την απομόνωση των ορότυπων *Salmonella gallinarum* και *Salmonella pullorum* θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εμπλουτιστικά υποστρώματα χωρίς ισχυρούς ανασχετικούς παράγοντες, όπως ο ζωμός Selenite Cystine.
- Σήμερα πολλά εργαστήρια προτιμούν την ενσωμάτωση νωπής χολής στα υποστρώματα αντί για χολικά άλατα.

4.1.3 Φάση απομόνωσης

A. Τόσο από τις καλλιέργειες σε Selenite Cystine Broth όσο και από τις καλλιέργειες σε Tetrathionate Broth της φάσης του εκλεκτικού εμπλουτισμού, γίνεται επιφανειακή σπορά, με τη βοήθεια κρίκου και με τρόπο ώστε να αναπτυχθούν απομονωμένες αποικίες, στα στερεά εκλεκτικά υποστρώματα Brilliant Green Agar ή Brilliant Green Sulfadiazine Agar, *Salmonella Shigella* Agar και Bismuth Sulfite Agar. Επώαση στους 35°C για 24 ± 2 ώρες. Στο υπόστρωμα Brilliant Green Agar οι αποικίες είναι άχρωμες ή ροζ.



ημιδιαφανείς ή αδιαφανείς ενώ το υπόστρωμα που τις περιβάλλει είναι ροζ προς κόκκινο. Ορισμένες σχηματίζουν διαφανείς πράσινες αποικίες, όταν περιβάλλονται από αποικίες βακτηριδίων που ζυμώνουν τη λακτόζη ή τη σακχαρόζη, δεδομένου ότι τα βακτηρίδια που ζυμώνουν τους προηγούμενους υδατάνθρακες σχηματίζουν αποικίες και ζώνες που έχουν κιτρινοπράσινο ή πράσινο χρώμα. Ποσοστό μικρότερο από 1% των σαλμονέλων είναι άτυπες με την έννοια ότι ζυμώνουν τη λακτόζη και σχηματίζουν κιτρινοπράσινες ή πράσινες αποικίες.

Στο υπόστρωμα S-S Agar οι αποικίες είναι άχρωμες ή έχουν ανοιχτό ροζ χρώμα, είναι αδιαφανείς, ημιδιαφανείς ή διαφανείς, ενώ πολλά στελέχη σχηματίζουν αποικίες με μαύρο κέντρο (παραγωγή H₂S).

Στο υπόστρωμα Bismuth Sulphite Agar οι αποικίες έχουν καφέ ή μαύρο χρώμα και σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν μεταλλική απόχρωση. Το υπόστρωμα γύρω από την αποικία αρχικά έχει καφέ χρώμα που μετατρέπεται σε μαύρο με την πρόοδο της επώασης. Ορισμένα στελέχη σχηματίζουν πράσινες αποικίες ενώ το υπόστρωμα που τις περιβάλλει έχει κάπως πιο σκοτεινή απόχρωση από το υπόλοιπο.

B. Από το καθένα από τα τρία υποστρώματα που παρουσιάζουν ανάπτυξη επιλέγονται δύο ή τρεις χαρακτηριστικές αποικίες και καθαροποιούνται σε Brilliant Green Agar ή σε McConkey Agar, στα οποία οι αποικίες των *Salmonella* εμφανίζονται διαφανείς, άχρωμες και σε ορισμένες περιπτώσεις με σκοτεινό κέντρο. Τα καθαρά στελέχη μεταφέρονται σε κεκλιμένο Nutrient Agar ή Trypticase Soy Agar.

5. Ταυτοποίηση του γένους *Salmonella*

5.1 Προκαταρκτικός βιοχημικός έλεγχος

1. Τα στελέχη της φάσης απομόνωσης, ενοφθαλμίζονται σε Triple Sugar Iron Agar και σε Lysine Iron Agar. Ο ενοφθαλμισμός γίνεται με την ίδια ακίδα που μεταφέρει μέρος από την αποικία τόσο στην επιφάνεια όσο και στο βυθό του Triple Sugar Iron Agar και του Lysine Iron Agar. Η επώαση γίνεται στους 35°C για 24 ± 2 ώρες και για τα δύο υποστρώματα. Εφόσον χρησιμοποιούνται σωλήνες με βιδωτά πώματα, τα πώματα παραμένουν χαλαρά για να εξασφαλιστεί αερόβιο περιβάλλον και να αποφευχθεί η υπέρμετρη παραγωγή H₂ *Salmonella*.



Όταν αναπτύσσεται *Salmonella* στο Triple Sugar Iron Agar ο βυθός έχει κίτρινο χρώμα (όξινο pH) και η κεκλιμένη επιφάνεια κόκκινο (αλκαλικό pH). Επίσης μπορεί να εμφανιστεί και μαύρο χρώμα εάν σχηματίζεται H₂ Salmonella (Τόσο οι σωλήνες που εμφανίζουν μαύρο χρώμα όσο και εκείνοι που δεν εμφανίζουν, κατακρατούνται για τις παραπέρα δοκιμές).

Όταν αναπτύσσεται *Salmonella* στο Lysine Iron Agar, όλο το υπόστρωμα έχει χρώμα πορφύρας (αλκαλικό pH). Όταν σχηματίζεται H₂S ο βυθός του υποστρώματος έχει μαύρο χρώμα.

Οι αποικίες στο Triple Sugar Iron Agar που δεν παρουσιάζουν τις χαρακτηριστικές αντιδράσεις των σαλμονελλών (συμπεριλαμβανόμενες και αυτές που σχηματίζουν κίτρινη λοξή επιφάνεια) δεν αποκλείονται από τις παραπέρα δοκιμές εφόσον δίνουν τις τυπικές αντιδράσεις των σαλμονελλών στο Lysine Iron Agar. (Το Lysine Iron Agar χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των σαλμονέλων οι οποίες ζυμώνουν τη λακτόζη).

2. Τα στελέχη τα οποία θεωρήθηκαν σαν πιθανές *Salmonella* με βάση τις χαρακτηριστικές αντιδράσεις τους στο Triple Sugar Iron Agar και Lysine Iron Agar, ενοφθαλμίζονται σε Christensen Urea Agar ή SSR Medium (δοκιμή ουριάσης) και παράλληλα υποβάλλονται στη δοκιμή οξειδάσης. Το γένος *Salmonella* δεν παράγει ουριάση και δίνει αρνητική τη δοκιμή οξειδάσης.
3. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν με βάση τις παραπάνω δοκιμές ενοφθαλμίζονται σε ζυμό Brain Heart Infusion και μετά από 18ωρη επώαση στους 35°C υποβάλλονται στις δοκιμές:
 - A. Παραγωγής β-γαλακτοσιδάσης (ONPG).
 - B. Απαμίνωσης φαινυλαλανίνης.
 - C. Ελέγχου κινητικότητας.

Εάν τα αποτελέσματα των παραπάνω δοκιμών υποδηλώνουν πιθανή *Salmonella*, τα στελέχη υποβάλλονται σε προκαταρκτικό ορολογικό έλεγχο με πολυδύναμους αντι-Ο και αντι-Η όρους.



5.2 Προκαταρκτικός ορολογικός έλεγχος

I. Οροσυγκόλληση με πολυδύναμο αντι-Ο όρο σε πλάκα: (Thatcher & Clark, 1968, ΑΡΗΑ 1976).

1. Στην επιφάνεια μιας αντικειμενοφόρου πλάκας ή στον πυθμένα ενός τρυβλίου σχηματίζονται με υαλογραφικό μολύβι τήξεως δύο κύκλοι διαμέτρου 1,5 cm περίπου.
2. Με τη βοήθεια κρίκου 3 mm μεταφέρεται μικρή ποσότητα (1/2 κρίκου) 24ωρης καλλιέργειας σε Nutrient Agar ή Trypticase Soy Agar και τοποθετούνται στο ανώτερο σημείο κάθε κύκλου.
3. Τοποθετείται μια σταγόνα στείρου φυσιολογικού ορού στο κατώτερο σημείο του κάθε κύκλου.
4. Με τη βοήθεια του κρίκου ή της ακίδας αναμιγνύεται καλά η καλλιέργεια με τη σταγόνα του φυσιολογικού ορού, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα ομοιογενές εναιώρημα.
5. Προσθήκη μιας σταγόνας αντι-Ο ορού στον μοναδικό κύκλο και ανάμιξη με κρίκο ή ακίδα.
6. Ανακίνηση του μίγματος με κινήσεις της πλάκας μπρος-πίσω για ένα λεπτό και παρατήρηση για ύπαρξη συγκόλλησης πάνω από μαύρο βυθό με τη βοήθεια πλάγιου φωτισμού.
7. Η αντίδραση (συγκόλληση) αξιολογείται:
 - Ως θετική όταν παρατηρείται συγκόλληση (έστω και ασθενής) μόνο στον κύκλο που προστέθηκε ο αντι-Ο ορός.
 - Ως αρνητική όταν και στους δύο κύκλους δεν παρατηρείται συγκόλληση.
 - Ως μη ειδική όταν παρατηρείται συγκόλληση και στους δύο κύκλους.

II. Οροσυγκόλληση με πολυδύναμο αντι-Η ορό σε σωλήνες (ΑΡΗΑ, 1976):

1. Προετοιμάζεται 24ωρη καλλιέργεια του στελέχους σε υπόστρωμα Nutrient Broth ή Trypticase Soy Yeast Extract Broth.
2. Αραιώνεται ο πολυδύναμος αντι-Η ορός (σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή) και ελέγχεται η δραστηκότητά του επάνω σε καλλιέργεια.



3. Αναμιγνύονται 5 ml καλλιέργειας του στελέχους σε H-Broth με 2,5 ml φορμολούχου φυσιολογικού ορού και αφήνεται να δράσει για τουλάχιστον μία ώρα.
4. Τοποθετούνται σε σωλήνες 10 X 75 mm ή 13 X 100 mm 0,5ml αραιωμένου αντι- H ορού.
5. Προσθέτονται 0,5 ml φορμολούχου καλλιέργειας.
6. Προετοιμάζεται σωλήνας-μάρτυρας με 0,5 ml φορμολούχου φυσιολογικού ορού και 5 ml καλλιέργειας.
7. Επώαση των μιγμάτων για μία ώρα στους 50°C και παρατήρηση κάθε 15 λεπτά. Στο τέλος του χρόνου σημειώνεται το αποτέλεσμα τους :
 - Ως θετικό όταν παρατηρείται συγκόλληση μόνο στο σωλήνα με το αντι-Η ορό.
 - Ως αρνητικό όταν και στους δύο σωλήνες δεν παρατηρείται συγκόλληση.
 - Ως μη ειδική συγκόλληση όταν παρατηρείται συγκόλληση και στο σωλήνα-μάρτυρα.

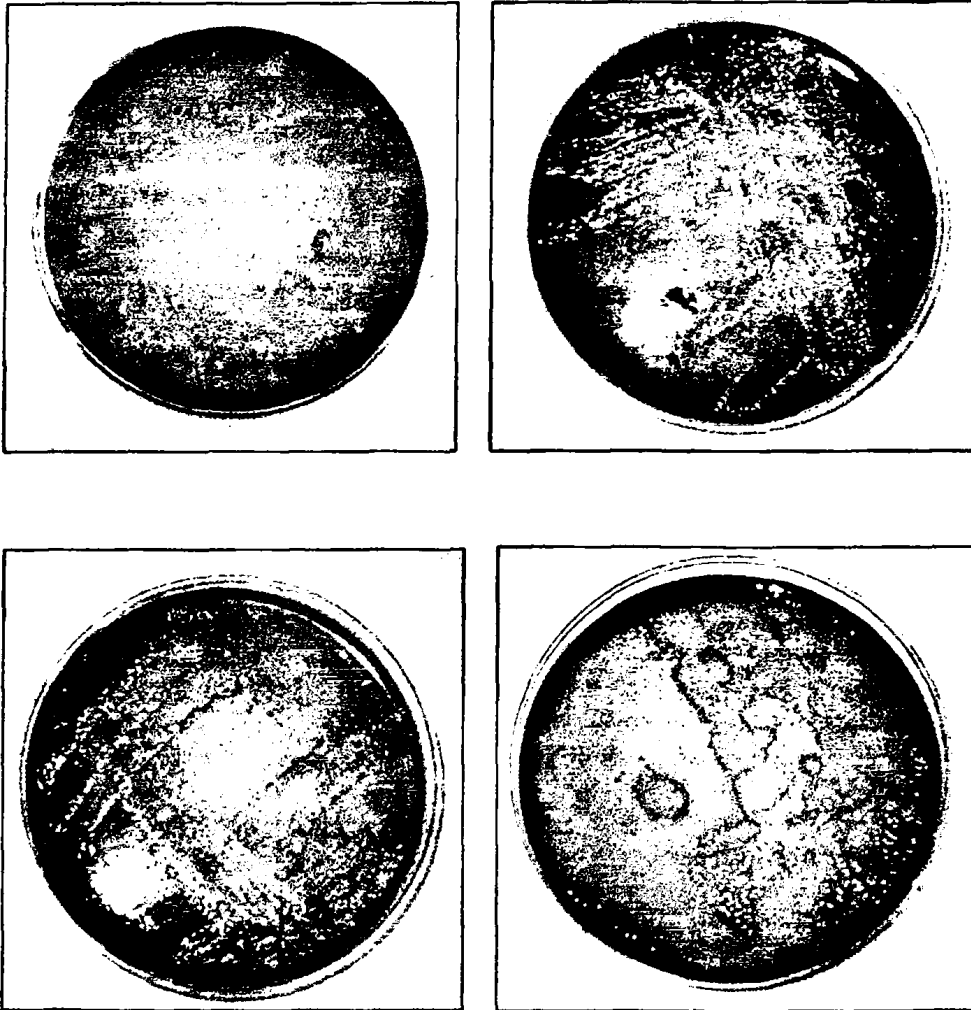
Σημείωση: Σε περίπτωση μη συγκόλλησης με αντι-Η ορούς η δοκιμή επαναλαμβάνεται αλλά με καλλιέργεια που τονώθηκε η κινητικότητά της ύστερα από 2-3 διόδους σε Motility Test Medium σε τρυβλία petri. Ενοφθαλμίζεται το στέλεχος σε ένα σημείο του τρυβλίου με γραμμική βάθους 2 mm νύξη και μετά την επώαση, γίνεται ανάκτηση του στελέχους από το πλέον απόμακρο σημείο διείσδυσης του στο υπόστρωμα.

5.3 Πλήρης βιοχημικός έλεγχος

- Τα στελέχη τα οποία με βάση τις δοκιμές του προκαταρκτικού βιοχημικού ελέγχου και την οροσυγκόλληση με τους πολυδύναμους αντι-Ο και αντι-Η ορούς θεωρήθηκαν ως προκαταρκτικώς θετικά για *Salmonella*, υποβάλλονται σε πλήρη βιοχημικό έλεγχο και εξετάζονται ως προς τις δοκιμές του πίνακα 3 και 4.
- Οι βιοχημικές δοκιμές γίνονται με χρήση ειδικών υποστρωμάτων, αντιδραστηρίων και τεχνικών.



- Εάν μετά τον πλήρη βιοχημικό έλεγχο το στέλεχος έχει χαρακτηριστικά *Salmonella*, αποστέλλεται σε ειδικό κέντρο ταυτοποίησης σαλμονέλων για την πλήρη ταυτοποίηση του ορότυπου.



Εικόνες 6, 7, 8, 9. Αποικίες *Salmonella* σε τρυβλία petri που περιέχουν το υπόστρωμα Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD).

Πίνακας 3.	
Βιοχημικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Salmonella</i> (Bergey's Manual, 1998)	
Παραγωγή καταλάσης	+
Δοκιμή οξειδάσης	-
Δοκιμή β-γαλακτοσιδάσης	D
Απαμίνωση φαινυλαλανίνης	-
Ανάπτυξη παρουσία KCN	+
Παραγωγή H ₂ S στο TSI Agar	+
Παραγωγή ινδόλης	-
Παραγωγή ουρεάσης	-
Δοκιμή MR	+
Δοκιμή VP	-
Χρησιμοποίηση κιτρικών αλάτων	+
Αναγωγή νιτρικών αλάτων	+
Χρησιμοποίηση μηλονικού Na	D
Υδρόλυση της ζελατίνης	D
Δοκιμή κινητικότητας	+
Αποκαρβοξυλίωση λυσίνης	+

D= Τα διάφορα είδη του ίδιου γένους δίνουν διαφορετικές αντιδράσεις.

d= Τα διάφορα στελέχη του ίδιου είδους ή ορότυπου δίνουν διαφορετικές αντιδράσεις.



Πίνακας 4.Βιοχημικά χαρακτηριστικά του γένους *Salmonella* (Bergey's Manual, 1998)

Αποκαρβοξυλίωση αργινίνης	+
Αποκαρβοξυλίωση ορνιθίνης	+
Ζύμωση γλυκόζης (παραγωγή αερίου στους 37°C)	+
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Αδονιτόλης	-
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Αραβινόζης	+
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Δουλισιτόλης	D
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Εσκουλίνης	-
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Ινοσιτόλης	d
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Λακτόζης	D
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Μαλτόζης	+
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Μαννιτόλης	+
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Ξυλόζης	+
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Σαλικίνης	-
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Σορβιτόλης	+
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Σακχαρόζης	-
Ζύμωση με παραγωγή μονο οξέος της: Τρεαλόζης	+

D= Τα διάφορα είδη του ίδιου γένους δίνουν διαφορετικές αντιδράσεις.

d= Τα διάφορα στελέχη του ίδιου είδους ή ορότυπου δίνουν διαφορετικές αντιδράσεις.



B) CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

1. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ BACILACEAE

Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει Gram θετικά βακτήρια, τα οποία είναι ελυτροφόροι, μη κινητοί, προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, με μορφή ράβδου (1-1,5 μm x 4-8 μm) που σχηματίζουν σπόρους εάν εκτεθούν στην παρουσία O₂. Το έλυτρο και η παραγωγή τοξινών αποτελούν ουσιώδεις παράγοντες για τη λοιμογόνο τους δύναμη (Bergey's Manual, 1974, Τζώρα, 2002).

2. ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΚΟΚΚΟΙ ΠΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΥΝ ΕΝΔΟΣΠΟΡΙΑ.

Τα βακτήρια και οι κόκκοι που σχηματίζουν ενδοσπόρια διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες (Bergey's Manual, 1974) :

- Αερόβια ή προαιρετικός αναερόβια. κύτταρα με μορφή ράβδου τα οποία συνήθως είναι θετικά ως προς την καταλάση (Γένος I. *Bacillus*).
- Μικροαερόφιλα κύτταρα τα οποία είναι αρνητικά ως προς την καταλάση (Γένος II. *Sporolactobacillus*).
- Αναερόβια κύτταρα τα οποία διαχωρίζονται σε :
- Μη ανάγοντα θειικά προς θειούχα (Γένος III. *Clostridium*).
- Ανάγοντα θειικά προς θειούχα (Γένος IV. *Desulfotomaculum*).
- Κύτταρα σφαιρικά, σε σωρούς (Γένος V. *Sporosarcina*).

3. Γένος *Clostridium*

Το γένος των *Clostridium* που ανήκει στην οικογένεια Bacilaceae κατά Bergey περιλαμβάνει ραβδίομορφα σπορογόνα βακτήρια. Στις καλλιέργειες όμως είναι δυνατόν να συναντώνται υπό διάφορες μορφές όπως υπό μορφή νηματίων, «λεμονοειδών» σωματίων 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 την χρησιμοποίηση ειδικών μεθόδων. Μάλιστα για ορισμένα το οξυγόνο, ακόμη και σε ίχνη, δρα ως δηλητήριο και προλαμβάνει την ανάπτυξή 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 *C. tertium* και το *C. 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 ικανότητα πολλαπλασιασμού, σχηματίζονται όμως και έχουν την ικανότητα διατήρησης των βακτηρίων κάτω από αντίξοες συνθήκες. Δεν προκαλούν νόσο και κάτω από κατάλληλες συνθήκες (θερμοκρασίας, pH) 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 σφαιρικόκοκκοί είναι κεντρικοί, τελικοί ή υποτελικοί. Η διάμετρος των σπόρων είναι συνήθως μεγαλύτερη της διαμέτρου του σώματος του βακτηριδίου και γι' αυτό τα *Clostridia* παίρνουν ανάλογο σχήμα, από το οποίο προέρχεται και το όνομα του γένους (Κλωστήρ = 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 τον 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, CO₂ H₂ και άλλα ενδιάμεσα προϊόντα τα οποία όμως δεν είναι δύσοσμα. Αντίθετα κατά την πρωτεόλυση σχηματίζονται δύσοσμα τελικά προϊόντα (H₂S, NH₃, 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*, το *C. tetani* και το *C. perfringens*. Στις παραγόμενες εξωτοξίνες και ένζυμα περιλαμβάνονται η λεκιθινάση, η κολλαγενάση, η υαλουρονιδάση, 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).

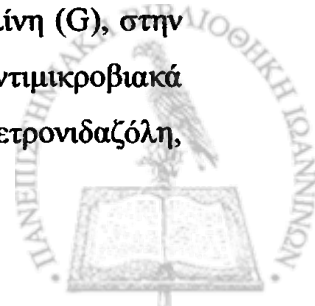
Τα *Clostridia* βρίσκονται σε αφθονία στο έδαφος. Μερικά είδη *Clostridium* (όπως το *C. perfringens* και το *C. sporogenes*), τα οποία φυσιολογικά ανευρίσκονται στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων, μετά το θάνατο εισέρχονται στους ιστούς και με την συνεργασία άλλων αερόβιων μικροβίων (όπως οι πρωτεΐς) προκαλούν σήψη των πτωμάτων. Τα *Clostridia* 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 εντερικής 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 *Clostridia* της αεριογόνου γάγγραινας (αναερόβια μυνέκρωση) ενοχοποιούνται κυρίως τα *C. perfringens*, *C. novy* και *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 ευαίσθητοι στην πενικιλίνη (G), στην ερυθρομυκίνη, στη 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 τους 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 5 (Βόιδαρου, 2002).

Πίνακας 5.	
Είδη <i>Clostridium</i> που προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο ¹ (Βόιδαρου, 2002).	
Είδη	Συχνότητα απομόνωσης ²
<i>C. perfringens</i>	22,6
<i>C. ramosum</i>	12,2
<i>C. innocuum</i>	11,2
<i>C. clostridiiforme</i>	9,6
<i>C. difficile</i>	6,2
<i>C. butyricum</i>	4,3
<i>C. cadaveris</i>	4,0
<i>C. bifermentans</i>	3,0
<i>C. sporogenes</i>	3,0
<i>C. septicum</i>	2,9
<i>C. tertium</i>	2,4
Διάφορα γνωστά είδη	6,6
Μη αναγνωρίσιμα είδη	12,0

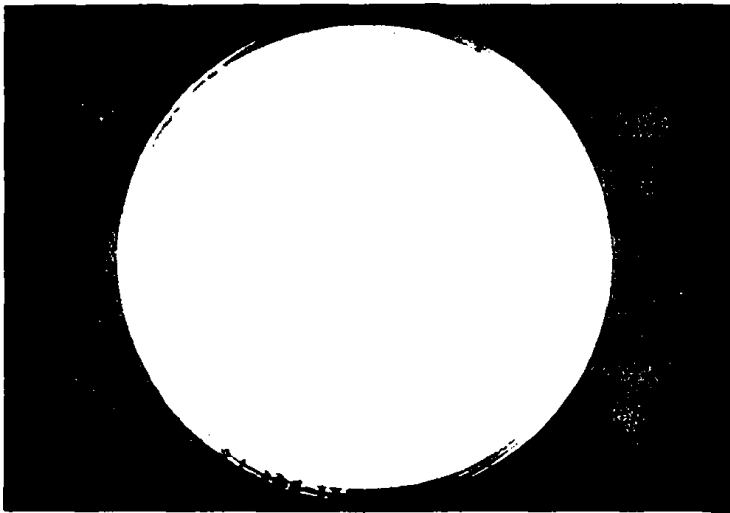
1: Από τους Allen και Baron, τροποποιημένος (Allen, Baron, 1991)

2: Ως 100% λαμβάνεται το σύνολο των κλωστηριδιακών λοιμώξεων



4. Μελέτη του είδους *Clostridium perfringens*

Ο μικροοργανισμός απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1891 και ονομάστηκε *Bacille d' Achalme* (Achalme, 1891). Αργότερα ο ίδιος μικροοργανισμός ονομάστηκε *Bacille welchii* (Wildson, 1931), που μετονομάστηκε τελικά σε *Clostridium perfringens*. Επίσης έχουν δοθεί οι παρακάτω ονομασίες: *Bacillus aerogenes capsulants* (Pasteur, 1877), *Bacillus phlegmonis emphysematosae* (Welch, 1892), *Bacillus emphysematosus vaginae* (Kruse, 1896), *Bacillus cadaveris butyricu*, *Bacillus perfringens* (Veillon and Zuber, 1898), *Bacterium welchii* (Migula, 1900), *Clostridium welchii* (Veillon and Zuber, 1898), *Clostridium perfringens* (Veillon and Zuber, 1898) (Βοΐδαρου, 2002).

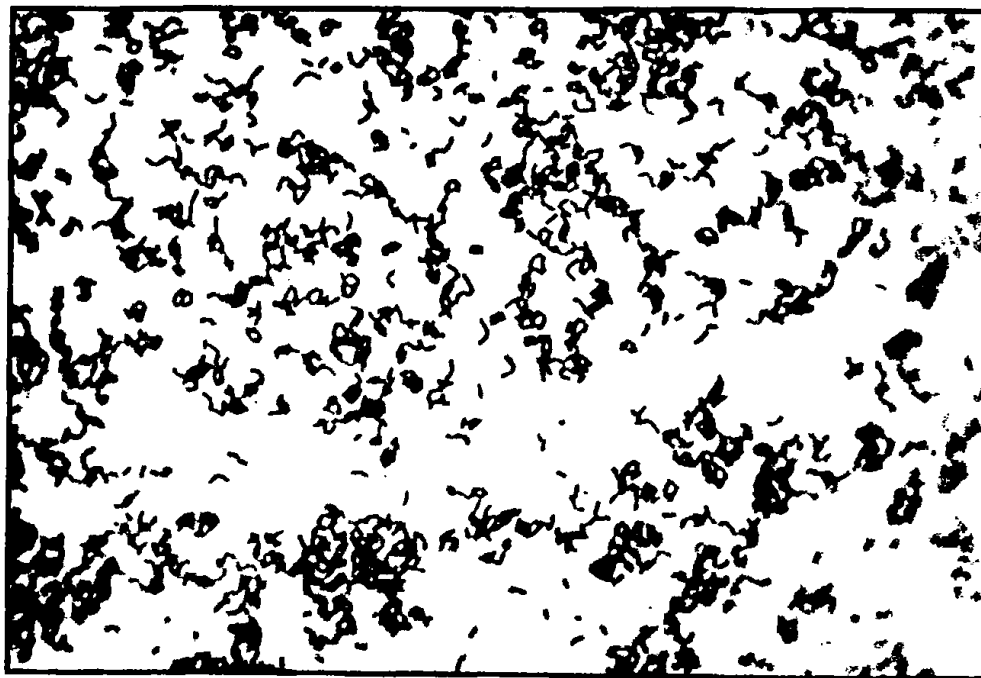


Εικόνα 10. Ανάπτυξη του *Clostridium perfringens* στο υπόστρωμα Egg Yolk Agar
(www.en.wikipedia.org, 2006).

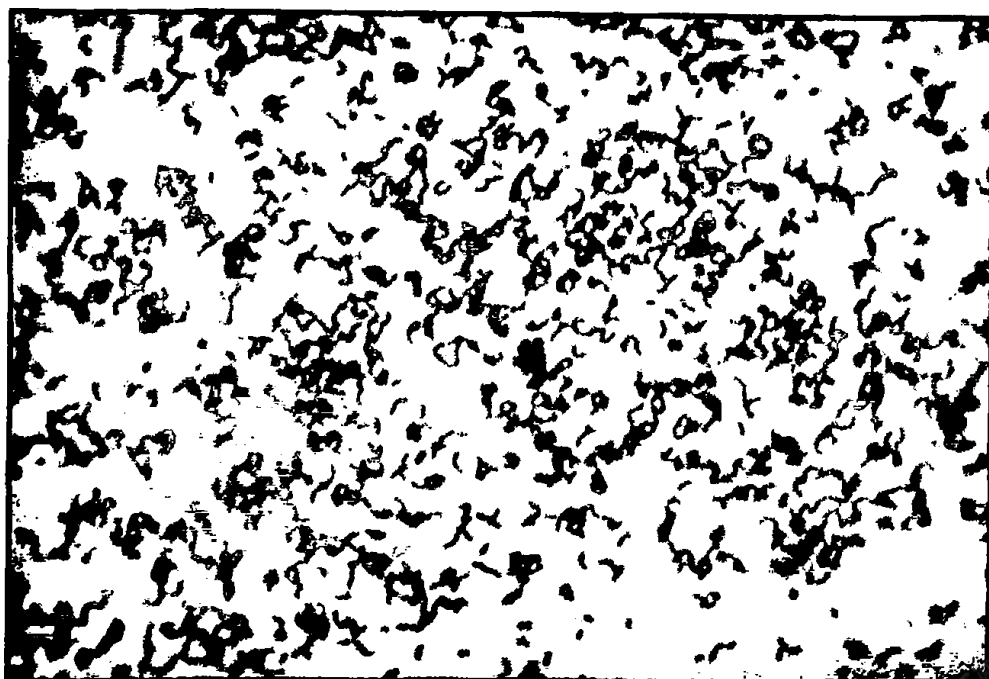
4.1 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες

Το *C. perfringens* είναι ένα Gram θετικό, σπορογόνο βακτηρίδιο, ευθύ, διαστάσεων 2-4 μm με 0,8-1,5 μm, με ορθογωνισμένες τις άκρες του. Τα κύτταρα του διατάσσονται μεμονωμένα ή σε μικρές αλυσίδες. Είναι το μόνο από τα παθογόνα *Clostridia* που δε φέρει βλεφαρίδες και είναι ακίνητο. Σε άμεσα παρασκευάσματα από τους ιστούς τα κύτταρα του μικροοργανισμού περιβάλλονται πολλές φορές από έλντρο, αλλά σπάνια στις *in vitro* καλλιέργειες. Είναι αναερόβιο, μπορεί όμως να αναπτυχθεί και σε ατμόσφαιρα με μικρή τιμή πίεσης οξυγόνου, της τάξης των 10-30 mm στήλης Hg. Έρευνες με αντικείμενο τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στελέχους *C. perfringens* τύπου A (Pickering, 1966) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αποτελείται από αλανίνη, 2,6 διαμινοπιμελικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, γαλακτοζαμίνη,

μανοζαμίνη, γαλακτόζη, φωσφορο και θανολαμίνη. Στο κυτταρικό τοίχωμο βακίλλου το διαμυνοπιμελικό οξύ βρίσκεται σε LL μορφή (Leyh-Bacille et al. 1969). Τα δομικά σάκχαρα του κυτταρικού τοιχώματος ποικίλουν από στέλεχος σε στέλεχος. Τα περισσότερα στελέχη περιέχουν ραμνόζη και γαλακτόζη, μερικά επίσης περιέχουν γλυκόζη. Ειδικά αντιγόνα από κάθε τύπου *C. perfringens* απομονώθηκαν από το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου με ειδικές τεχνικές και βρέθηκε ότι πρόκειται για ένα πολυσακχαρίτη ή μουκοπεπτίδιο, στο οποίο η παρουσία εξοζαμυδατάνθρακα, ακετυλοομάδας και πρωτεΐνης είναι επιβεβαιωμένη (Johnson et al. 1969).



Εικόνα 11. Gram θετικά βακτήρια του γένους *Clostridium*.



Εικόνα 12. Gram θετικά βακτήρια του γένους *Clostridium*.

Η πλειοψηφία των στελεχών του *C. perfringens* (περίπου τα τρία τέταρτα αυτών) διαθέτουν έλυτρο, γεγονός που αποδεικνύεται με την αρνητική χρώση αυτών με την χρήση της ινδικής μελάνης (Lee & Cherniak, 1974-Smith, 1975).

4.2 Καλλιεργητικοί χαρακτήρες

Αναπτύσσεται σε αναερόβιες συνθήκες και καλλιεργείται εύκολα σε κοινά θρεπτικά υλικά, η προσθήκη όμως 1% γλυκόζης στα υλικά ευνοεί την ανάπτυξη του. Το *C. perfringens* κατά την ανάπτυξη του σε αιματούχο άγαρ σχηματίζει μετά από 18ωρη επώαση στους 37°C χαρακτηριστικές αποικίες που έχουν διάμετρο 1-3 mm, οι οποίες είναι ελαφρώς κυρτές, ημιδιαφανείς και με σαφή περιφέρεια. Όταν η επώαση παραταθεί για περισσότερο χρόνο, οι αποικίες γίνονται μεγαλύτερες με διάμετρο 3-8 mm, άλλοτε με σπαρμένο κέντρο και άλλοτε με ομαλό πάχος. Η περιφέρεια είναι λεπτή και συνήθως ανώμαλη. Οι αποικίες σε αιματούχο άγαρ περιβάλλονται χαρακτηριστικά από διπλή ζώνη αιμόλυσης, μια εσωτερική πλήρους αιμόλυσης (προκαλείται από τη δράση της α-τοξίνης) και μια εξωτερική ατελούς αιμόλυσης (προκαλείται από τη δράση της θ-τοξίνης). Οι ζώνες είναι περισσότερο ευδιάκριτες αν χρησιμοποιηθεί αίμα προβάτου ή ανθρώπου για τη παρασκευή του αιματούχου άγαρ, και λιγότερο με τη χρήση αίματος αλόγου. Στα θερμοανθεκτικά δε στελέχη του βακτηρίου η εσωτερική ζώνη αιμόλυσης είναι συχνά απύσα. Εκτός από τις τυπικές αποικίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, το είδος *C. perfringens* μπορεί να σχηματίζει βλενώδεις, ρυτιδώδεις ή νανώδεις αποικίες (Βοΐδαρου, 2002).

Τα κύτταρα που αποτελούν τις βλενώδεις αποικίες είναι ελυτροφόρα, ενώ τα κύτταρα που αποτελούν τις νανώδεις αποικίες έχουν νηματοειδή μορφή. Κατά την ανάπτυξη του *C. perfringens* σε καλλιεργητικό μέσο γάλακτος το υλικό γίνεται όξινο, σχηματίζεται πήγμα, παράγονται αέρια τα οποία διασπώντας το πήγμα του προσδίδουν σπογγώδη σύσταση (Stormy clot ή Stormy fermentation). Ερευνητική ομάδα παρατήρησε για πρώτη φορά το 1961 (Colle et al., 1961) την απότομη εξαφάνιση κυττάρων του *C. perfringens*, τα οποία είχαν μόλις ενοφθαλμισθεί σε καλλιεργητικά υλικά και επώασθηκαν σε θερμοκρασίες 50-51°C. Όμως, αργότερα, ελάχιστα κύτταρα του *C. perfringens*, που επιβίωσαν μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν και να συνεχίσουν για αρκετές ώρες σε θερμοκρασία λίγο κατώτερη από 50°C. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε «Φαινόμενο phoenix» (Βοΐδαρου, 2002).

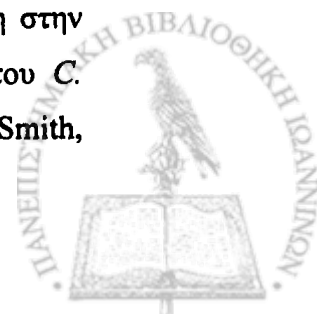


Το είδος *C. perfringens* έχει αυξημένες τροφικές ανάγκες (Bryant, 1969), αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 6,5° - 50°C (Hobbs, 1969 -McClane, 1997) με άριστη θερμοκρασία τους 45°C (Smith, 1971), στην οποία ο χρόνος αναπαραγωγής του είναι μόλις 10min, (Labbe & Juneja, 2001). Εντούτοις, η άριστη θερμοκρασία για την παραγωγή των διάφορων ενζύμων από τα στελέχη του είδους *C. perfringens* είναι χαμηλότερη από τους 45°C. Ο χρόνος ανάπτυξης μπορεί να είναι αρκετά σύντομος για το *C. perfringens*, το οποίο, πιθανόν, είναι ο πιο γρήγορα αναπτυσσόμενος γνωστός μικροοργανισμός. Χαρακτηρίζεται από αξιόλογη ευαισθησία στις θερμοκρασίες κατάψυξης και στην παρατεταμένη διατήρησή του στη θερμοκρασία ψυγείου (Strong et al., 1966).

Στον πίνακα 6 αναγράφεται η σχέση θερμοκρασίας και χρόνου ανάπτυξης του *C. perfringens*.

Πίνακας 6. Θερμοκρασία και χρόνος ανάπτυξης του <i>C. perfringens</i> (Smith, 1972)	
Θερμοκρασία	Χρόνος ανάπτυξης, pH=7.0
25°C	100 min
30°C	50 min
35°C	34 min
40°C	12,5 min
45°C	10 min
50°C	15 min

Αναπτύσσεται σε pH 5,0-9,0, με άριστο pH το 7,0. Οι νεαρές καλλιέργειες είναι ευαίσθητες στην οξύτητα του γαστρικού υγρού (Genigeorgis, 1975). Το pH κάτω του 5,0 και άνω του 9,0 δρα ανασταλτικά στην καλλιέργεια του μικροοργανισμού. Ανάπτυξη των στελεχών του *C. perfringens* παρατηρείται σε pH κάτω του 5,0 μόνο όταν η θερμοκρασία επώασης είναι κάτω από τους 45°C (McClane, 1997). Αναπτύσσεται σε ανώτατες τιμές Eh από +31 μέχρι +230mV, ενώ το άριστο Eh είναι περίπου -200mV, δηλαδή για την ανάπτυξη του δεν απαιτούνται αυστηρά αναερόβιες συνθήκες (Duncan, 1974, Labbe 2000). Η ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού (a_w) στα υποστρώματα ανάπτυξης του (τρόφιμα ή θρεπτικά υλικά) είναι 0,93 (Strong et al., 1970 -Bartsch & Walker, 1982), η δε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του αρχίζει από $a_w=0,995$ (Strong et al., 1970). Η ανάπτυξη του *C. perfringens* αρχίζει να επηρεάζεται σε συγκεντρώσεις NaCl 3% ή υψηλότερες (Smith,



1970 - McClane, 1997). Το εύρος συγκέντρωσης % του NaCl για την ανάπτυξη του *C. perfringens* εξαρτάται από την θερμοκρασία επώασης. Τα διάφορα στελέχη αναπτύσσονται σε συγκεντρώσεις NaCl μέχρι 8%, αλλά αναστέλλονται σε συγκεντρώσεις 10% (Gough & Alford, 1965). Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι το *C. perfringens* αντέχει σε αυξημένες συγκεντρώσεις, μέχρι 500 ppm, νιτρικών και νιτρωδών αλάτων, λόγω δε της ιδιότητάς του αυτής, αναπτύσσεται εύκολα στα αλλαντικά. Παρατηρείται τόσο υψηλή τιμή του χρονικού διαστήματος ανάπτυξης, ώστε συμβατικά δεν μπορεί να υπολογισθεί. Αρκετά χημικά υλικά έχουν σχεδιαστεί για την ανάπτυξη του *C. perfringens* (Βοΐδαρου, 2002).

4.3 Παθογένεια

Το *Clostridium perfringens* βρίσκεται στο εξωτερικό περιβάλλον και στο πεπτικό σύστημα (παχύ έντερο) των ζώων σαν μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Όταν ο πεπτικός σωλήνας λειτουργεί κανονικά, το *C. perfringens* πολλαπλασιάζεται και παράγει τοξίνες, αλλά αυτό γίνεται με μέτρια ένταση και χωρίς ορατές συνέπειες για τη φυσιολογική ισορροπία του οργανισμού. Τα φαινόμενα αυτά μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία αντισωμάτων και την πρόκληση ανοσίας (Graven, 2001).

Σε περιπτώσεις διαταραχής των παραγόντων ισορροπίας που επικρατούν στο γαστρεντερικό οικοσύστημα, το βακτήριο πολλαπλασιάζεται γρήγορα και έντονα και παράγει σε μεγάλη ποσότητα τις ισχυρές του τοξίνες. Ύστερα από τοπική δράση στο εντερικό επιθήλιο, περνούν στην κυκλοφορία του αίματος (τοξιναιμία), όπου καταστρέφουν το ενδοθήλιο των αγγείων και έπειτα εισδύουν σε όλα τα όργανα, στα κύτταρα των οποίων ασκούν τη βλαπτική τους δράση (γενική τοξίνωση). Η δράση των τοξινών στο εντερικό επιθήλιο έχει σαν αποτέλεσμα τη νέκρωσή του και την αύξηση της διαπερατότητάς του από τις τοξίνες και τα βακτήρια. Για αυτό τη φάση της τοξιναιμίας ακολουθεί η φάση της βακτηριαιμίας. Οι τοξικοί παράγοντες που πρωταγωνιστούν στα παθολογικά φαινόμενα των εντεροτοξιναιμιών είναι οι α, β και ε. Για να προκληθεί επομένως η νόσος δεν αρκεί η παρουσία του βακτηρίου στο έντερο, αλλά πρέπει να δημιουργηθεί το κατάλληλο έδαφος για τον πολλαπλασιασμό και την τοξινογένεσή του (Willis et al., 1990).



Οι προδιαθέτοντες παράγοντες διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς (Σκούφος, 2002).

Ενδογενείς είναι:

- Η ηλικία του ζώου.
- Το είδος του ζώου.
- Η φυλή: Η θρεπτική κατάσταση.

Εξωγενείς παράγοντες είναι:

- Οι κλιματολογικές συνθήκες.
- Μεγάλη ποσότητα τροφής και κυρίως πλούσια σε υδατάνθρακες.
- Ο απότομος υπερσιτισμός με πρωτεΐνες.
- Στρεσικοί παράγοντες.
- Αντιβιοτικά που χορηγούνται από το στόμα.
- Διάφορες παρασιτώσεις.
- Ενδοτοξίνη της *Escherichia coli*.
- Τροφές έντονα μολυσμένες από το *C. perfringens*.

4.4 Βιοχημικές ιδιότητες

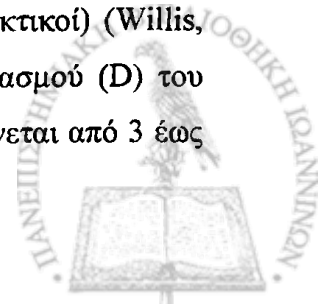
Το είδος *C. perfringens* διασπά τη φρουκτόζη, γαλακτόζη, ινοσιτόλη, μαννόζη, γλυκόζη, λακτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη και άμυλο. Μερικά στελέχη διασπούν επίσης και τη κελλοβιόζη, ινσουλίνη, σαλικίνη όχι όμως τη μαννιτόλη, τη δουλιτιόλη, τη ξυλόζη, την αμυγδαλίνη, την αδοιτιόλη, την αραβινόζη, την κυτταρίνη, την ερυθριτόλη, την εσκουλίνη, την μελιβιόζη, την ριβόζη και τη σορβιτόλη (Mansson & Smith, 1962). Ρευστοποιεί την ζελατίνη, η οποία γίνεται μερικές φορές με αργό ρυθμό, και προκαλεί πήξη του γάλακτος με ταυτόχρονη παραγωγή αερίου (το γάλα γίνεται σαν σφουγγάρι, Stormy fermentation). Έχει μικρή πρωτεολυτική ικανότητα. Στα προϊόντα ζύμωσης του μικροοργανισμού βρίσκεται το προπιονικό, οξικό και το βουτυρικό οξύ, με ή χωρίς την παραγωγή βουτανόλης. Το ένζυμο ουρεάση μπορεί να παραχθεί από στελέχη του *C. perfringens* τύπου Β και Ε. Έρευνες δε αναφέρουν ότι τα δύο τρίτα των απομονωθέντων στελεχών από νεκρωτική εντερίτιδα του ανθρώπου παράγουν το ανωτέρω ένζυμο (Brooks, 1961). Ο μικροοργανισμός ανάγει τα νιτρικά, αν και το χαρακτηριστικό αυτό, εξαρτάται από το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας που θα χρησιμοποιηθεί (Βοΐδαρου, 2002).



Ινδόλη δεν παράγεται από τα διάφορα είδη του *C. perfringens*, όπως επίσης δεν παράγεται και καταλάση, ενώ αναφέρεται η παραγωγή υδρογόνου. Η ακετυλομεθυλοκαρβινόλη ή ακετοΐνη (αντίδραση Vosges Proskauer) μπορεί να παραχθεί σπάνια από διάφορα στελέχη του *C. perfringens*. Η αιμόλυση στο αιματούχο άγαρ παρατηρείται λόγω της δράσης της α , β και δ τοξίνης, αλλά η εμφάνιση αυτής επηρεάζεται από το στέλεχος και το είδος του *C. perfringens* καθώς επίσης και από το είδος του ζώου που προέρχεται το αίμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη παραγωγή του αιματούχου άγαρ. Σε καλλιέργεια *C. perfringens* σε egg-yolk agar παράγεται λεκιθινάση C, αλλά ουδέποτε λιπάση. Η λεκιθινάση C υδρολύει τη λεκιθίνη σε φωσφορυλοχολίνη και σε ένα διαλυτό διγλυκερίδιο, που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ιριδίζουσας ζώνης (άλως) γύρω από τις αποικίες σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει λέκιθο αυγού, δίνοντας θετική την αντίδραση Nagler για την ανίχνευση λεκιθινάσης. Επίσης το άθροισμα των αζωτούχων βάσεων G + C στα DNA είναι 24 - 27 moles % (Βοΐδαρου, 2002).

4.5 Σπόροι του *C. perfringens*

Το *C. perfringens*, ως μέλος της οικογένειας Bacillaceae, έχει ως χαρακτηριστικό του γνώρισμα τον σχηματισμό μέσα στο μητρικό κύτταρο, του ενδοσπορίου, που θεωρείται ως «λανθάνον κύτταρο (dormant cell)» και είναι αυτό που τα διαχωρίζει από όλα τα άλλα βακτήρια, γνωστά ως «ασπορογόνα». Το ενδοσπόριο των βακτηρίων αποδεδειγμένα δεν είναι προϊόν αναπαραγωγής, αλλά μια βλαστική μορφή ανθεκτική στις αντιξοότητες του περιβάλλοντος (λανθάνουσα). Το *C. perfringens* παράγει σπόρο ωοειδή, κεντρικό ή υποτελικό, ο οποίος δεν προκαλεί διόγκωση του μικροβιακού σώματος (Rahman, 1978). Οι σπόροι είναι ανθεκτικότεροι έναντι των φυτικών μορφών στην θερμότητα, στα βραχεία κύματα ακτινοβολίας και στις χημικές ουσίες. Η μεγάλη τους ανθεκτικότητα οφείλεται στο αδιαπέραστο περίβλημα τους, στην χαμηλή τιμή ενεργότητας νερού (a_w) και την υψηλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο και διπικολινικό οξύ (Miyata et al., 1997 - Strong et al., 1970- Beamanetal, 1984). Οι σπόροι των περισσότερων στελεχών του *C. perfringens* τύπου A επιβιώνουν στους 80°C αλλά καταστρέφονται σε 5-60 min στους 100°C (Τζαννετής, 1987). Ωστόσο, οι σπόροι ορισμένων στελεχών επιζούν ύστερα από έκθεση τους στους 100°C (βρασμός), επί 1 έως 6 ώρες (θερμοανθεκτικοί) (Willis, 1969 - Rhodehamel & Harmon, 1998). Ο δε χρόνος υποδεκαπλασιασμού (D) του αριθμού των σπόρων στελεχών του *C. perfringens* στους 90°C κυμαίνεται από 3 έως



145 min (Roberts, 1969). Ανάλογες διακυμάνσεις εμφανίζει η αντοχή των σπόρων στην ακτινοβολία γ όπου οι τιμές D κυμαίνονται από 0,12 - 0,34 megarads (Roberts, 1969). Η παραγωγή των σπόρων ευνοείται σε αλκαλικό περιβάλλον και δεν λαμβάνει χώρα σε θρεπτικά υλικά όπου υπάρχει pH μικρότερο από 6,6 και κατά συνέπεια σε υλικά που περιέχουν σάκχαρα τα οποία διασπώνται από τον μικροοργανισμό (Granum & Magnussen, 1987). Σε άμεσα παρασκευάσματα από τους ιστούς δε διαπιστώνεται στις περισσότερες περιπτώσεις η παρουσία σπόρου μέσα στο κύτταρο, επειδή η σπορογονία δεν είναι συνηθισμένη κατά την ανάπτυξη του μικροβίου στο μεγαλοοργανισμό. Σπόρους, επίσης, παράγει το *C. perfringens* στο οικοσύστημα του γαστρεντερικού σωλήνα και κατά την καλλιέργεια αυτού σε θρεπτικά υλικά πτωχά σε γλυκόζη, τα οποία δεν ευνοούν την ανάπτυξή του. Έρευνες, έδειξαν ότι η πλειοψηφία των σπόρων των θερμοάντοχων στελεχών, απαιτεί θερμική υποστήριξη για να βλαστήσει, που ποικίλλει από 75°C μέχρι 100°C και για χρόνο από 10 λεπτά μέχρι 2 ώρες (Βοΐδαρου, 2002).

Η θερμική επεξεργασία, όταν πραγματοποιείται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες ή για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, μπορεί να αδρανοποιήσει τον μηχανισμό βλάστησης, χωρίς όμως να θανατώσει τους σπόρους (Duncan et al., 1972). Είναι χαρακτηριστικό να αναφερθεί ότι η θερμική επεξεργασία άνω των 100°C ή η επίδραση ισχυρών αλκαλικών ουσιών, απομακρύνουν διαλυτή πρωτεϊνική στοιβάδα από το εξωτερικό του σπόρου (Duncan et al. 1972). Οι τροποποιημένοι, αυτοί σπόροι, είναι ανίκανοι να βλαστήσουν και εμφανίζονται αρκετά «γηρασμένοι» ακόμη και σε καλλιέργειες που περιέχουν πλούσια υλικά σπορογονίας (Βοΐδαρου, 2002).

4.6 Αντίγονα – Τοξίνες

Το *C. perfringens* έχει ένα πολυσακχαριδικό αντίγονο ελύτρου ειδικό που προκαλεί παραγωγή συγκολλητινών με τις οποίες αντιδρά καθώς και άλλα σωματικά αντίγονα. Η υποδιαίρεση των διάφορων στελεχών δε γίνεται σε αντιγονικούς (με βάση τα αντίγονα), αλλά σε τοξινικούς τύπους (με βάση τις τοξίνες), που παράγουν τα διάφορα στελέχη. Το *C. perfringens* παράγει πάνω από 13 διαφορετικές τοξίνες. Οι σημαντικότερες χαρακτηρίζονται με τα μικρά γράμματα της ελληνικής αλφαβήτου (α, β, γ, δ, ε, η, θ, ι, κ, λ, μ και ν) και παρουσιάζουν διαφορετική αντιγονική ειδικότητα. Οι τοξίνες αυτές είναι πρωτεϊνικής φύσης και με την προσθήκη φορμόλης μετατρέπονται σε ανατοξίνες, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά εμβολίων. Οι τοξίνες αυτές διαχωρίζονται σε κύριες και δευτερεύουσες. Οι κύριες



τοξίνες είναι η α, β, ε και ι. Με βάση αυτές τις τέσσερις τοξίνες το *C. perfringens* διακρίνεται σε πέντε τύπους (Α, Β, C, D και Ε) (Sterne & Warrack, 1964). Ο τύπος Α παράγει την τοξίνη α, ο τύπος Β παράγει τις τοξίνες α, β, και ε, ο τύπος C παράγει τις τοξίνες α και β, ο τύπος D παράγει τις τοξίνες α και ε και τύπος Ε παράγει τις τοξίνες α και ι. Ο κάθε τύπος παράγει τον ακόλουθο συνδυασμό των κυρίων τοξινών (πίνακας 7) (Βοΐδαρου, 2002, Κέγκος, 2003).

Αντιγονικοί τύποι <i>C. perfringens</i> ¹	Πίνακας 7. Τοξίνες ² του <i>C. perfringens</i> (Βοΐδαρου, 2002).											
	α	β	ε	ι	δ	θ	κ	λ	μ	ν	N ³	E ⁴
A	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
B	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
D	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+

1: από τους Hatheway & Rood & Cole, τροποποιημένος

2: + : παράγεται από μερικά στελέχη, - : δεν παράγεται

N : νευραμιδάση

4: E : εντεροτοξίνη

Πίνακας 8.

Τοξίνες των τοξινικών τύπων του *C. perfringens* (Βόϊδαρου, 2002).

ο	Κύριες τοξίνες				Δευτερεύουσες τοξίνες							
	α	β	ε	Ι	Υ	δ	η	θ	κ	κ	μ	ν
	Λεκιθινάση Θανατηφόρος Νεκρωτική Αιμολυτική	Θανατηφόρος Νεκρωτική	Θανατηφόρος Νεκρωτική	Θανατηφόρος	Θανατηφόρος	Θανατηφόρος Αιμολυτική	Θανατηφόρος	Αιμολυτική	Κολλαγενάση	Πρωτεϊνάση	Υαλουρονιδάση Π	ύΝΑάση
A	++	00	00	0	0	00	I	+	++	00	+++	++
B	+	+++	+++			0+		++	++	0	+++	+
C	++	+++	00	0	0	+++	+	++	+++	00	00	++
D	+	+	0	0	+	00		++	+++	0	+	+++
E	+++	+++	++	0	+	00		+	+++	++	++	++
	++	+++	+0					++	++	+++	+	++
	+	00		0	+			+	++			++
	++				+			++	+++			+
	+			0				++				++
	++			0			I	+				++
	+			++				++				
	++			+				+				
	+											
	++											
	+						III					

+++ = παράγεται από τα περισσότερα στελέχη

++ = παράγεται από αρκετά στελέχη

+ = παράγεται από λίγα στελέχη

0 = δεν παράγεται από κανένα στέλεχος

- = δεν διερευνήθηκε



4.6.1 Κύριες τοξίνες

α- τοξίνη:

Η α-τοξίνη είναι η καλύτερα μελετημένη από όλες τις κλωστηριδιακές φωσφολιπάσες (PLC). Πρόκειται για μια λεκιθινάση (φωσφολιπάση C) η οποία έχει την ιδιαιτερότητα να είναι η πρώτη βακτηριακή τοξίνη με ενζυματική δραστηριότητα, που μελετήθηκε (Lood, 1991). Η καθαρή τοξίνη έχει μοριακό βάρος 43 Kda και ισοηλεκτρικό σημείο 1 (Hatheway, 1990) Είναι η κύρια θανατηφόρα τοξίνη των στελεχών του *C. perfringens* τύπου A. Παράγεται όμως σε μικρότερες ποσότητες από όλους τους τύπους του είδους *C. perfringens*. Είναι σχετικά θερμοάντοχη αλλά ευαίσθητη στην δράση της θρυψίνης. Η μέγιστη δράση της επιτυγχάνεται με την παρουσία κατιόντων, όπως ασβεστίου (Ca^{++}) και μαγνησίου (Mg^{++}) (Ispolatovskaya, 1972). Ο ψευδάργυρος αυξάνει την παραγωγή της α-τοξίνης σε εργαστηριακές καλλιέργειες και είναι απαραίτητος για να εκδηλώσει τη δραστηριότητα της *in vivo*. Τα υπολείμματα ιστιδίνης θεωρούνται επίσης απαραίτητα γιατί προσανατολίζουν κατάλληλα τα ιόντα ψευδαργύρου (Titball, 1990).

Η α-τοξίνη χαρακτηρίζεται ως αιμολυτική, καταστρέφει τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια, τα λευκά αιμοσφαίρια. Επίσης φαίνεται να δρα νεκρωτικά στις μεμβράνες των μυϊκών κυττάρων και να αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων (Titball, 1993 -Titball, 1997 - Sakurai, 1995).

β-τοξίνη:

Η β-τοξίνη παράγεται από το *C. perfringens* τύπο B και C (παλιός τύπος F, ο οποίος παράγει σε μικρή ποσότητα τη β-τοξίνη), και η σχέση της με νοσήματα του ανθρώπου και των παραγωγικών ζώων έχει γίνει γνωστή από τις αρχές της δεκαετίας 1930.

Είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 28 Kda. Έχει θανατηφόρες και νεκρωτικές ιδιότητες, όχι όμως αιμολυτικές. Σήμερα προκαλεί στον άνθρωπο νεκρωτική εντερίτιδα ή τη νόσο pig-bel, μια ενδημική νόσο της φυλής Papua στη Νέα Γουινέα, και είναι ο κύριος παθογόνος παράγοντας σε περιπτώσεις εντεροτοξιναιμίας των προβάτων και αλλοιώσεις νεκρωτικής εντερίτιδας στον άνθρωπο και σε πολλά είδη ζώων.



ε-τοξίνη:

Η ε-τοξίνη είναι η αμέσως ισχυρότερη κλωστηριδιακή τοξίνη μετά τις νευροτοξίνες του *C. botulinum* και του *C. tetani*. Αποτελεί τον κύριο τοξικό παράγοντα του τύπου D, από τον οποίο παράγεται σε μεγάλες ποσότητες, ενώ σε μικρότερες ποσότητες παράγεται από τον τύπο Β. Έχει νεκρωτικές και θανατηφόρες ιδιότητες που προκαλεί βλάβες των ενδοθηλιακών αγγείων. Δεν έχει αιμολυτική ικανότητα (Buxton, 1978).

ι-τοξίνη:

Παράγεται ως πρωτοξίνη μόνο από στελέχη *C. perfringens* τύπου Ε και μετατρέπεται σε τοξίνη με τη δράση πρωτεολυτικών ένζυμων (θρυψίνη) (Stiles, 1986 - Coles et al., 1997). Έχει θανατηφόρες και νεκρωτικές ιδιότητες, όχι όμως αιμολυτική ικανότητα (Sakurai & Kobayashi, 1995).

4.6.2 Δευτερεύουσες τοξίνες

γ-τοξίνη:

Παράγεται μόνο από μερικά στελέχη τύπου Β και C του *C. perfringens*. Είναι θανατηφόρα και νεκρωτική χωρίς αιμολυτική ικανότητα.

δ-τοξίνη:

Παράγεται σταθερά από τα στελέχη του τύπου C και από μερικά στελέχη του τύπου Β (Yamagishi et al., 1971). Είναι εξαιρετικά αιμολυτική και θανατηφόρα για τα μηρυκαστικά και τους χοίρους, όχι όμως για τα άλλα είδη ζώων (Alouf et al, 1981- Stevens et al., 1993).

η-τοξίνη:

Παράγεται από μερικά στελέχη του τύπου Α του *C. perfringens*. και έχει μικρή θανατηφόρο δράση.

θ-τοξίνη:

Παράγεται από όλα τα στελέχη του *C. perfringens*, που απομονώνονται από τον άνθρωπο και τα ζώα, αλλά κυρίως από τον τύπο C και λιγότερο από τους



υπόλοιπους. Η θ-τοξίνη είναι μια θερμοευαίσθητη και οξυγονοευαίσθητη αιμολυσίνη με νεκρωτικές και θανατηφόρες ιδιότητες σε μεγάλες δόσεις. Έχει μοριακό βάρος 74 Kda , η δε ,ι-λυσίνη βρέθηκε να είναι το μοναδικό αμινοτελικό αμινοξύ.

Μοιάζει με την αιμολυσίνη του *C. tetani*, του στρεπτόκοκκου και του πνευμονόκοκκου. Λύει τα ερυθροκύτταρα, τα λευκά αιμοσφαίρια και άλλα κύτταρα των ιστών (Mollby, 1973 - Hauschild et al., 1973). Η θανατηφόρος δράση της θ-τοξίνης θεωρείται ακαριαία, ώστε όταν το πειραματόζωο λάβει δυο θανατηφόρες δόσεις πεθαίνει μέσα σε 2-5 λεπτά.

β₂- τοξίνη:

Η β₂- τοξίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1997 από ερευνητικό εργαστήριο της κτηνιατρικής σχολής της Βέρνης από στέλεχος *C. perfringens* που προκάλεσε νόσο σε χοίρους στην Ελβετία (Gkiourtzidis et al.,2001). Οι πληροφορίες που υπάρχουν για την δράση της είναι πολύ λίγες και η έρευνα σχετικά με την παθογένεια της βρίσκεται ακόμη στα πρώτα στάδια (Bacciarini, 2001). Μελλοντικές έρευνες θα δείξουν αν αποτελεί έναν νέο παθογόνο τύπο για τον άνθρωπο και τα ζώα ή αν ανήκει σε έναν από τους ήδη υπάρχοντες.

κ-τοξίνη:

Πρόκειται για μια κολλαγενάση (δηλαδή υδρολύει το κολλαγόνο) και παράγεται από τους τύπους A, C και E καθώς και από μερικά στελέχη των τύπων B και C του *C. perfringens*.

λ-τοξίνη:

Παράγεται από τα περισσότερα στελέχη των τύπων B και E του *C. perfringens* και από μερικά στελέχη του τύπου D (Bidwell, 1950 -Hatheway, 1990).

μ-τοξίνη:

Παράγεται από τα περισσότερα στελέχη των τύπων A και B και από μερικά στελέχη των τύπων D και C (Bidwell , 1950 - Hatheway , 1990).



ν-τοξίνη:

Είναι μια δεσοξυριβοζονουκλεάση, η οποία παράγεται από τα στελέχη όλων των τύπων του *C. perfringens*, εκτός αυτών που απομονώθηκαν από περιπτώσεις νεκρωτικής εντερίτιδας σε ανθρώπους της Νέας Γουινέας. Δεν έχει θανατηφόρες, νεκρωτικές ή αιμολυτικές ιδιότητες.

Όμως, είναι πιθανόν υπεύθυνη για την καταστροφή των λευκοκυττάρων που παρατηρείται στην αεριογόνο γάγγραινα, στην ουρητηρική μόλυνση, καθώς και σε λοίμωξη μετά την αποβολή κυήματος.

4.6.3 Εντεροτοξίνη του *Clostridium perfringens*

Η εντεροτοξίνη του *Clostridium perfringens* (enterotoxin-CPE) είναι μια τοξίνη που παράγεται από μερικά στελέχη του *C. perfringens* τύπου A και προκαλεί τροφοδηλητηριάσεις στους ανθρώπους (Stark & Duncan, 1971- McDonl, 1979). Είναι πρωτεΐνη μοριακού βάρους 3,5 KDa, με ισοηλεκτρικό σημείο στα 4,3.

Βρέθηκε ότι τα στελέχη τύπου A του *C. perfringens* και ελάχιστα στελέχη του τύπου C παράγουν εντεροτοξίνη κατά τη φάση της σπορογονίας (Duncan et al, 1972, Duncan 1973, Venura et al., 1974). Το ποσό της εντεροτοξίνης αυξάνει ανάλογα με την ένταση της σπορογονίας (Tsai, 1974, Venura et al., 1974). Η έκθεση στελεχών του *C. perfringens* σε ακραίες συνθήκες (θερμοπληξία στους 65°C-100°C και επακόλουθη διατήρηση στους 4° και 20°C) ευνοεί τη σπορογονία και αυξάνει τα ποσά της παραγόμενης εντεροτοξίνης (Nichida et al., 1963, Venura et al., 1974).

5. Κατανομή του *Clostridium perfringens* στο περιβάλλον

Το *C. perfringens* είναι ο πιο διαδεδομένος αναερόβιος μικροοργανισμός (Smith & Williams, 1984).

Έδαφος

Το *C. perfringens* είναι ευρύτατα διαδεδομένο στο φυσικό περιβάλλον (Smith & Holdeman, 1968 – Willis, 1969). Οι σπόροι του είναι καθολικά διασπαρμένοι στο έδαφος, στην σκόνη, στα ρούχα των ανθρώπων, στους θαλάμους και στα χειρουργεία των νοσοκομείων (Collee, 1975). Αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι δεν υπάρχει δείγμα εδάφους στο οποίο να μην υπάρχουν σπόροι του *C. perfringens* (μόνο η άμμος της Σαχάρας αποτελεί εξαίρεση (Smith & Williams, 1984). Αυτό εξηγεί και την μεγάλη

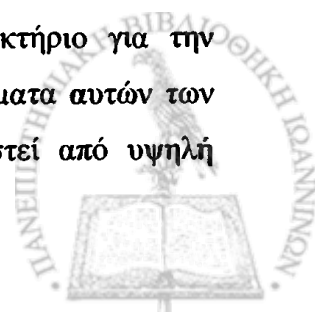


συχνότητα απομόνωσης του από διάφορα τραύματα, χωρίς βέβαια να είναι ικανό πάντοτε να προκαλεί και αεριογόνο γάγγραινα (Βοΐδαρου, 2002).

Ο αριθμός των βλαστικών μορφών του *C. perfringens* ποικίλλει καθώς έχουν εξετασθεί αρκετά δείγματα εδάφους. Τα αποτελέσματα όμως έχουν δείξει θετικά δείγματα μέχρι 90% (από 4000 κύτταρα /g έως 50000 κύτταρα /g (Smith & Gardner, 1949- Miwa, 1975). Η ύπαρξη, βλαστικών μορφών του *C. perfringens* στο έδαφος, σημειοδοτεί το γεγονός ότι ο μικροοργανισμός μπορεί και πολλαπλασιάζεται ενεργά σε αυτό και ότι το έδαφος αποτελεί πραγματική και κύρια αποθήκη του μικροβίου στο περιβάλλον. Η οικολογική κατανομή των σπόρων έχει γεωγραφική ποικιλία και σχετίζεται με διάφορες παραμέτρους, όπως ο αντιγονικός τύπος του *C. perfringens* και οι περιβαλλοντικές συνθήκες (Βοΐδαρου, 2002).

Τα στελέχη του *C. perfringens* τύπου B, C, D, και E τα οποία είναι υποχρεωτικά παράσιτα των οικιακών ζώων και περιστασιακά του άνθρωπο, ζουν λίγους μήνες στο έδαφος χωρίς να μπορούν να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους. Οι βλαστικές τους μορφές θανατώνονται μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα και παραμένει μόνο ένας συγκεκριμένος αριθμός ανθεκτικών σπόρων από αυτά (Smith, 1975). Αντίθετα τα στελέχη του *C. perfringens* τύπου A είναι ευρύτατα διαδεδομένα στο έδαφος, θεωρώντας το ως φυσικό περιβάλλον επιβίωσης, βλάστησης και ολοκλήρωσης του κύκλου τους. Όμως, τα στελέχη τύπου A του *C. perfringens* τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί από δείγματα εδάφους, διαφέρουν από τα στελέχη που έχουν ταυτοποιηθεί από το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου, βιοχημικά και κυρίως στο γεγονός ότι τα πρώτα είναι πιο ανθεκτικά στην τοξική επίδραση του NaCl (Beerens & Delcourte, 1985).

Το *C. perfringens* έχει γίνει αντικείμενο έρευνας από ομάδες που ασχολούνται με την οικολογία των μικροβίων, στην προσπάθεια να κατανοηθεί η αλληλοεπίδραση περιβάλλοντος και βακτηρίου και οι δραστηριότητες του στο φυσικό περιβάλλον. Αντικείμενο των παραπάνω ερευνών αποτελούν και αρκετά δείγματα εδάφους από διάφορες περιοχές της γης που εξετάστηκαν για την ύπαρξη στελεχών του *C. perfringens*, όπως από την Ανταρκτική, Ιαπωνία, Κίνα, Αυστραλία, Ρωσία (Miwa, 1975). Ερευνήθηκε η επίδραση ενός μεγάλου αριθμού υδατανθράκων που βρίσκονται στο έδαφος στην διαδικασία σπορογονίας του *C. perfringens*, ως πιθανός παράγοντας του οικοσυστήματος «έδαφος», που χρησιμοποιείται από το βακτήριο για την επιβίωση του σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών έδειξαν ότι πράγματι το έδαφος μπορεί να χαρακτηριστεί από υψηλή



ρυθμιστική ικανότητα. Η οικολογική αξία των υδατανθράκων του φυσικού περιβάλλοντος συνίσταται στο σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν στην ενεργητικότητα και στον τροπισμό του μικροβιολογικού φορτίου του εδάφους (Volkana, 1988).

Νερό

Ο τύπος του *C. perfringens* που έχει απομονωθεί από τα υδάτινα οικοσυστήματα είναι ο Α τύπος και περιστασιακά οι άλλοι τύποι. Τα υδάτινα περιβάλλοντα χαρακτηρίζονται, ως επί το πλείστον, ως ολιγοτροφικά (μικρή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά). Σε τέτοια είδους περιβάλλοντα είναι δύσκολο οι βλαστικές μορφές του *C. perfringens* να πολλαπλασιασθούν. Η ύπαρξη μεγάλου αριθμού βλαστικών μορφών και σπόρων στα υδάτινα οικοσυστήματα θεωρείται ως εισβολή του είδους μέσω των περιττωμάτων ανθρώπων, ζώων, λυμάτων πόλεων και βιομηχανιών. Αυτός είναι και ο λόγος της καθιέρωσής του ως δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης (WHO, ΑΡΗΑ). Οι σπόροι του, εξαιτίας της ανθεκτικότητάς τους στις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος, θεωρούνται και ως δείκτες μόλυνσης παλιάς προέλευσης. Ακόμη, οι σπόροι χρησιμοποιούνται ως δείκτες ανεπαρκούς απολύμανσης του πόσιμου νερού μιας πόλης, λόγω της ανθεκτικότητας που εμφανίζουν στα απολυμαντικά σηπτικά μέσα. Σε περιοχές υδάτινων οικοσυστημάτων που βρίσκονται κοντά στην απόρριψη λυμάτων οικιστικών ή βιομηχανικών, οι αριθμοί του *C. perfringens* είναι αυξημένοι (Κέγκος, 2003).

Ζώα- άνθρωπος

Το *C. perfringens* θεωρείται φυσιολογικός έποικος του εντερικού σωλήνα του ανθρώπου (κυρίως ο τύπος Α) (Yamagishi et al., 1976-Legakis et al., 1981) του κόλπου και του τραχήλου των υγιών γυναικών (1-9%) (Ledger & Hachett, 1973), του οφθαλμού (Gorbach et al., 1973-Bartlett et al., 1977), του δέρματος (Κέγκος, 2003) των ουρητήρων και της ουρήθρας (Headihgton & Beyerlein, 1966).

Το *C. perfringens* και ειδικότερα οι σπόροι του, έχουν αναφερθεί ως πολύτιμος και χρήσιμος δείκτης ύπαρξης στρεσογόνων παραγόντων στο περιβαλλοντικό οικοσύστημα (Bezirtzoglou, 1996). Ειδικότερα έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας πολύ ευαίσθητος «ανιχνευτής» στρεσογόνων συνθηκών για το οικοσύστημα του γαστρεντερικού σωλήνα ανθρώπου και ζώων (Panagiotou et al., 1998). Σε πειραματόζωα που εκτέθηκαν σε στρεσογόνες συνθήκες, όπως χαμηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος, ψυχρό ντους, ηλεκτρικό shock, στέρηση τροφής, αποδείχθηκε αύξηση των απομονωθείσών βλαστικών μορφών και ιδιαίτερα των



σπόρων του *C. perfringens* από τα κόπρανα των πειραματόζωων σε σχέση με τα επίπεδα του *C. perfringens* στα κόπρανα των ζώων πριν την εφαρμογή του stress (Bezirtzoglou et al., 1999).

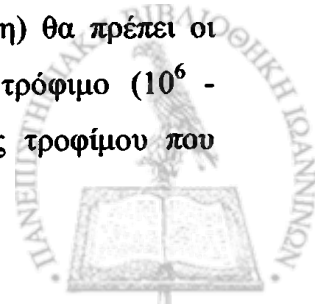
Η μεταχείριση των ζώων πριν από τη σφαγή επηρεάζει τον βαθμό προσβολής των μεσεντέριων λεμφογάγγλιων και γενικά των ιστών από το *C. perfringens*, το οποίο υπάρχει ήδη στη μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού αυλού (Genigeorgis, 1975). Αυξημένη παρουσία στα λεμφογάγγλια του βακτηρίου, εμφανίζεται μετά από εξάντληση, ασθένεια και «σφαγή υπό αγωνία». Τα χρόνια νοσήματα και η διαχείριση των ζώων σε έντονες συνθήκες (όχληση) επηρεάζουν το βαθμό αποβολής του μικροβίου με τα κόπρανα. Η αυξημένη αποβολή του *C. perfringens* με τα κόπρανα των ζώων έχει σαν αποτέλεσμα να μολύνεται το δέρμα των ίδιων των ζώων, το περιβάλλον, καθώς και τα άλλα ζώα που μεταφέρονται μαζί ή παραμένουν στους ίδιους χώρους (Genigeorgis, 1975).

Η σταθερή παρουσία αντισωμάτων (ειδική αντιεντεροτοξίνη) στον ορό του αίματος είναι ιδιαίτερα συχνή και παρατηρείται σε ποσοστό 65-90% των υγιών ατόμων και των ζώων (Torres-Angel, 1974-Uemura et al., 1974). Τα αντισώματα αυτά εξουδετερώνουν την εντεροτοξίνη του *C. perfringens* in vitro και πιθανόν και στην κυκλοφορία του αίματος, όχι όμως στον αυλό του εντέρου (Hauschild, 1971-Nillo et al., 1971). Η παραγωγή των αντισωμάτων αυτών στον άνθρωπο και στα ζώα φαίνεται ότι σχετίζεται με τη σχεδόν μόνιμη μικροβιοφορία. Το βακτήριο διεισδύει στην κυκλοφορία και δια της πυλαίας φλέβας φτάνει στο ήπαρ και στους λεμφαδένες. Στους νεφρούς και στον σπλήνα απαντάται σπανίως και συνήθως ύστερα από ενδογενή μόλυνση (Narayan, 1966- Cygan & Jastrebski, 1969).

Επίσης, έχει αναφερθεί επιβίωση μικρού αριθμού θερμοανθεκτικών σπόρων στο μυϊκό σύστημα των κρεατοπαραγωγών ζώων, ύστερα από ενδογενή μόλυνση, η οποία θεωρείται επικίνδυνη (Genigeorgis, 1975), γιατί κάτω από συνθήκες ανεπαρκούς διατήρησης του κρέατος σε χαμηλές θερμοκρασίες, οι σπόροι βλαστάνουν και αναπτύσσεται μεγάλος αριθμός βλαστικών μορφών που είναι ικανός να προκαλέσει τροφική δηλητηρίαση (Genigeorgis, 1975).

Τρόφιμα

Το *C. perfringens* είναι ευρύτατα κατανεμημένο στα διάφορα είδη τροφίμων. Για να καταστεί επικίνδυνο για τον καταναλωτή (τροφική λοίμωξη) θα πρέπει οι βλαστικές μορφές του να περιέχονται σε μεγάλο αριθμό στο τρόφιμο (10^6 - 10^8 κύτταρα / ανά g τροφίμου). Επικίνδυνο όμως είναι ένα είδος τροφίμου που



περιέχει μικρό αριθμό σπόρων και ευνοεί την βλάστησή τους και τον πολλαπλασιασμό τους λόγω μη σωστής συντήρησής του. Πολλά παραδείγματα τροφολοιμώξεων αναφέρονται με αίτιο το *C. perfringens*, εξαιτίας της μη σωστής ψύξης των τροφίμων μετά από θερμική επεξεργασία (Κέγκος, 2003).

Τα ποσοστά απομόνωσης στελεχών *C. perfringens* από διάφορα είδη κρέατος κυμαίνονται από 37% έως 82%. Σπόροι του βακτηρίου απομονώθηκαν από κρέατα, σε ποσοστό 1.5% έως 42.7%. Σε σφαγεία αιγοπροβάτων, αγελάδων, πουλερικών τα ποσοστά παρουσίας στελεχών *C. perfringens* ευρέθησαν αντίστοιχα 52%, 82%, 58% (Κέγκος, 2003).

Σε σάλτσες, σε σούπες, πατατοσαλάτες, έχουν βρεθεί σπόροι του. Οι τροφές αυτές αποτελούν ιδανικό αναερόβιο περιβάλλον για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Κέγκος, 2003).

Το κρέας από τα πουλερικά μολύνεται εύκολα γιατί δεν αφαιρείται το δέρμα των πουλερικών κατά τη σφαγή. Κατά την αποπτίλωσή τους, που γίνεται με το βάλπιμα του πτηνού σε δεξαμενή νερού θερμοκρασίας 50-55°C, μολύνεται το πτηνό με μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο νερό του ζεματίσματος. Τα νερά αποπτίλωσης είναι σημαντική πηγή μόλυνσης του πτηνού με *C. perfringens*, ως διαφαίνεται. Επίσης, από τα σπλάχνα πουλερικών του εμπορίου έχει απομονωθεί *C. perfringens* σε ποσοστό 75% (Κέγκος, 2003).

Φυτά

Παρά την αυξημένη χρήση διαφόρων φυτών για θεραπευτικούς σκοπούς δεν υπάρχουν επίσημες αναφορές για το μικροβιακό φορτίο των φυτών αυτών, ούτε έχουν καθορισθεί κρίσιμα όρια μικροβιολογικών, κινδύνων για την προάσπιση της Δημόσιας Υγείας. Σε μια προσπάθεια να εκτιμηθεί η φύση και το ποσοστό μικροβιακής μόλυνσης των φυτών, που χρησιμοποιούνται στη θεραπευτική, μελετήθηκαν επτά διαφορετικά είδη φυτών. Σπόροι του *C. perfringens* απομονώθηκαν από το 83,9% των δειγμάτων αυτών (Martins et al., 2001-Bezirtzoglou, 2002).

Το *C. perfringens* απαντάται και σε άλλα είδη φυτών, εκτός από αυτά που χρησιμοποιεί η ιατρική επιστήμη. Συχνά ενοχοποιούνται διάφορα βελτιωτικά σκευάσματα της γεύσης και της εμφάνισης των τροφίμων για την πρόκληση τροφικής δηλητηρίασης από το *C. perfringens* (Genigeorgis, 1975- Eisgruber, 1987). Το νοσοκομείο Victor Jouselin Dreux της Γαλλίας ανέφερε το 1989, τρεις περιπτώσεις τοξικής κολίτιδας, μετά την κατανάλωση *Citrullus colocynthis* (κολοκυθιού). Μετά



από μικροβιολογική διερεύνηση των ανωτέρω περιστατικών, απομονώθηκε *C. perfringens* τύπου Α σε μεγάλο ποσοστό από τα κόπρανα των ασθενών, ταυτόσημο με τον ορότυπο του *C. perfringens* που απομονώθηκε από το ύποπτο τρόφιμο *Citrullus colocynthis* (κολοκύθι) (Coldfaine et al., 1989).

6. Εργαστηριακή διάγνωση του *C. perfringens*

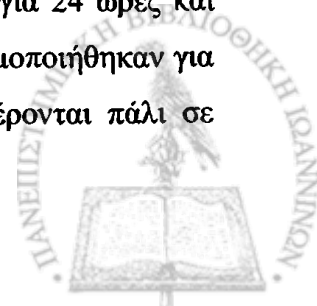
Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση του *C. perfringens* είναι :

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

6.1.1 Μέθοδος ενσωματώσεως

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται σε δυο φάσεις :

- **Φάση αριθμώσεως των θειοαναγωγικών *Clostridium*** : Από τις διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του τροφίμου γίνεται ενοφθαλμισμός σε διπλή σειρά τρυβλίων με όγκο ενοφθαλμίσματος 1 ml. Το ενοφθάλμισμα 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 45°C 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 37°C 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.
- **Φάση ταυτοποίησης και αριθμώσεως του *C. perfringens***: 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 αριθμηση 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 (H₂S) —————> +
- Παραγωγή λεκιθινάσης —————> +
- Ζύμωση της λακτόζης —————> +
- Αναερόβιωση —————> +
- 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.

6.1.2 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 ενοφθάλμισμα γίνεται επιστοιβάδευση ποσότητας 5-8 ml από το ίδιο το υπόστρωμα για να σχηματισθεί στοιβάδα επικάλυψης.

Η αριθμηση και η ταυτοποίηση του *C. perfringens* γίνεται όπως και στη μέθοδο της ενσωμάτωσης.



6.1.3 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 ενοφθαλισμό τριπλής ή πενταπλής σειράς σωλήνων οι οποίοι περιέχουν Cooked Meat Medium ή Liquid Sulfite Cycloserine Medium. Όταν πρόκειται να ενοφθαλιστούν 10 ml (1g) από την αραιώση 10^{-1} στερεού δείγματος ή 10 ml υγρού δείγματος, τότε η πρώτη σειρά σωλήνων περιέχει 10 ml υπόστρωμα διπλής συγκέντρωσης. Στις υπόλοιπες σειρές χρησιμοποιούνται υπόστρωμα κανονικής συγκέντρωσης, ενώ ο όγκος του ενοφθαλμίσματος είναι 1 ml από τις αντίστοιχες αραιώσεις. Οι σωλήνες που περιέχουν το υπόστρωμα, πριν τον ενοφθαλισμό, 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.



6.2 Ταυτοποίηση

6.2.1 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.

6.2.2 Αντιβιογράμμα (ευαισθησία με την τεχνική δίσκων)

Σε εμπλουτισμένο θειογλυκολικό ζωμό πραγματοποιείται ανάπτυξη 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 μgr).

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 :

Πίνακας 9. Αντιβιοτικά			
	Κολιστίνη	Πενικιλίνη	Βανκομυκίνη
<i>C. perfringens</i> (και είδη <i>Clostridium</i> που παράγουν α-τοξίνη)	A	E ^A	Δ

A : ανθεκτικό (δια < 10mm)

E^A : συνήθως ευαίσθητο και ορισμένα στελέχη ανθεκτικά

Δ : ποικίλη αντίδραση



6.2.3 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 (αναφέρεται στο κεφάλαιο βιοχημικές αντιδράσεις).

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

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ	Πίνακας 10. ΕΙΔΗ <i>CLOSTRIDIUM</i>			
	<i>C. perfringens</i>	<i>C. barati</i>	<i>C. bifermentans</i>	<i>C. sordellii</i>
Κινητικότητα	-		+	+
Ζύμωση λακτόζης	+		-	-
Ρευστοποίηση ζελατίνης	+		+	+
Παραγωγή ουρεάσης	±		-	+



+ 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*.

6.2.4 Ορθόδοξη 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.

6.2.4.1 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 N₂, H₂, 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.



6.2.4.2 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. Οι βιοχημικές δοκιμές που εκτελούνται για την απομόνωση του *C. perfringens* περιγράφονται στο ειδικό κεφάλαιο βιοχημικές δοκιμές.

6.2.5 Νέες μέθοδοι ταυτοποίησης 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 (pic) 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 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.

6.2.6 Συστήματα επώασης αναερόβιων καλλιιεργειών

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

- Χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (eh) και
- 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 καλλιιεργειών:

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



Π. ΠΕΡΙΟΧΗ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΜΕΛΕΤΗΣ

1. Περιοχή μελέτης

Την περιοχή μελέτης για τη συλλογή των δεδομένων που παρουσιάζονται στην παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί ο Αμβρακικός κόλπος. Οι δειγματοληψίες των υπό μελέτη περιττώματων των άγριων σπονδυλωτών πτηνών, πραγματοποιήθηκαν στο βάλτο της Ροδιάς και στα νησάκια της λιμνοθάλασσας Τσουκαλιό και Λογαρού. Πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «Αρχιμήδης Ι» με θέμα «Γεωργία, περιβάλλον και βιοποικιλότητα σε γεωργικά αγροοικοσυστήματα της Δυτικής Ελλάδας» που εκπονείται από το Τμήμα Ζωικής Παραγωγής του ΤΕΙ Ηπείρου. Η συλλογή των κοπράνων έγινε με τη χρήση βαμβακοφόρου στυλεού, τα οποία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς αποστειρωμένους περιέκτες. Η επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τις δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκε στο μικροβιολογικό εργαστήριο του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν εξήντα (60) δείγματα από περιττώματα από άγρια πτηνά την χρονική περίοδο Σεπτέμβριο του 2005 – Μάιος 2006, που καλύπτει το μεταναστευτικό κύκλο των αποδημητικών πουλιών και την περίοδο της αναπαραγωγής .



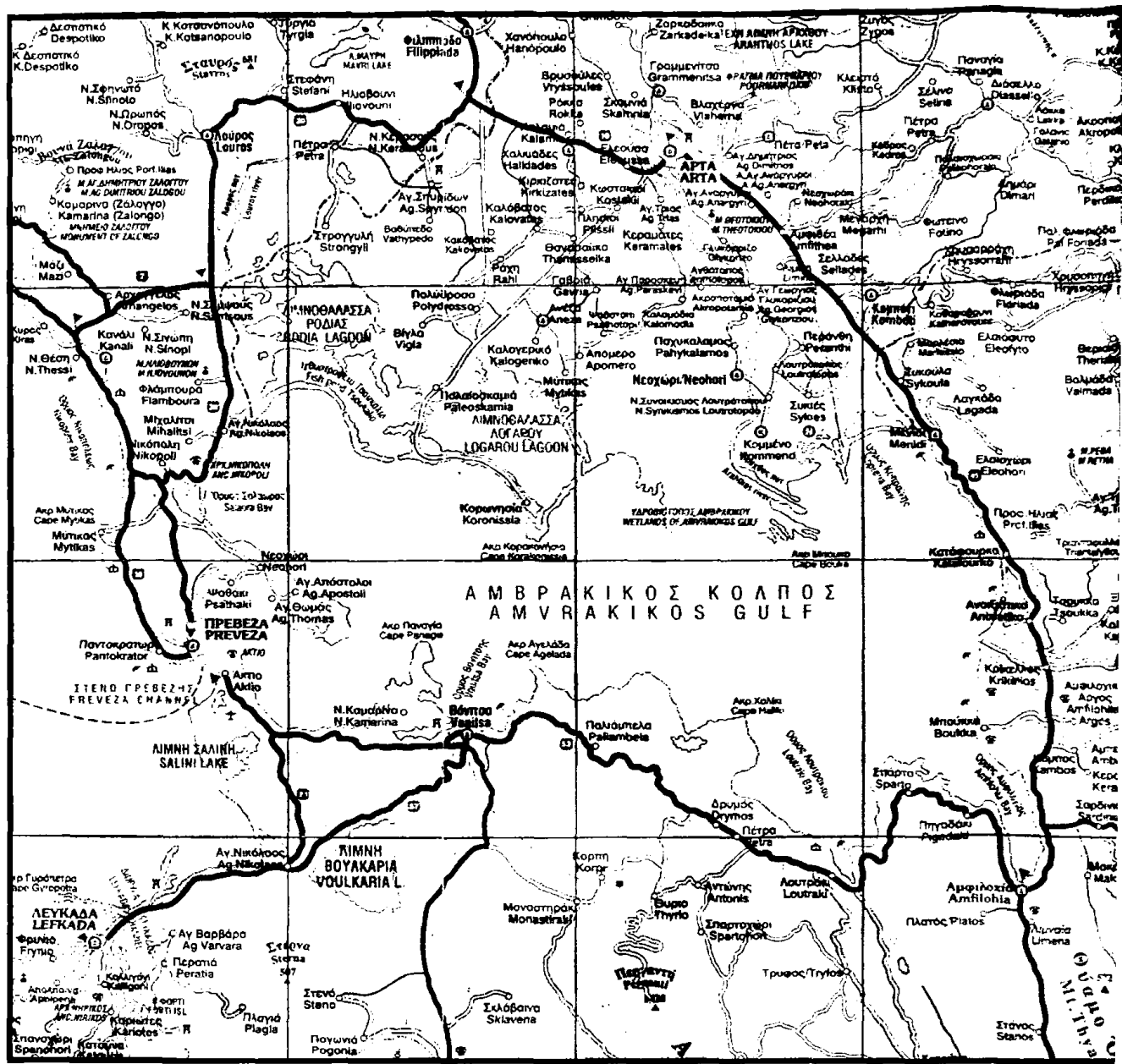


Χάρτης 1. Αμβρακικός Κόλπος (www.greeklanascapes.com, 2006).



Χάρτης 2. Αμβρακικός Κόλπος (www.greeklanascapes.com, 2006).





Χάρτης 3. Αμβρακικός Κόλπος (www.emvelia.gr, 2006).

Ο Αμβρακικός κόλπος εισδύει εικοσιπέντε (25) περίπου χιλιόμετρα προς την ενδοχώρα της δυτικής Ελλάδας και δημιουργεί μια θαλάσσια έκταση τριακοσίων πενήντα (350) τετραγωνικών χιλιομέτρων με μέγιστο βάθος τα εξήντα (60) μέτρα. Αποτελεί έναν κλειστό μεσογειακό κόλπο με πολλές ιδιαιτερότητες. Επικοινωνεί με το Ιόνιο με ένα διάυλο πλάτους λίγων εκατοντάδων μέτρων και βάθους δέκα (10) μέτρων στο στενό Πρέβεζας- Άκτιου. Δέχεται τα γλυκά νερά δύο μεγάλων ποταμών, του Λούρου και του Άραχθου, καθώς και μικρότερων ποταμών (Βωβός, Κρικελιώτης). Η βασική ιδιαιτερότητα του εντοπίζεται στο ότι στις ακτές του υπάρχουν πολλοί σημαντικοί υγρότοποι, ιδιαίτερα μάλιστα σ' ολόκληρο το βόρειο



τμήμα του, όπου τα δύο μεγάλα ποτάμια έχουν δημιουργήσει ένα εκτεταμένο υδροτοπικό σύμπλεγμα διακοσίων πενήντα (250) τετραγωνικών χιλιομέτρων γνωστό για τη μοναδική ποικιλία οικοτόπων και την παρουσία και διαβίωση εκεί μιας πολύ ενδιαφέρουσας ορνιθοπανίδας που περιλαμβάνει πολλά σπάνια και απειλούμενα είδη πτηνών (Περγαντής, 2001).

Αυτό το παράκτιο υδροτοπικό σύμπλεγμα μεσογειακού τύπου περιλαμβάνει παράκτιες λίμνες (Βουλκαρία, Σάλτινη) λιμνοθάλασσες (Τσιοπέλι, Ροδιά, Τσουκαλιό, Λογαρού και Σακουλέσι στο βόρειο τμήμα, Κατάφουρκο στο ανατολικό, Ρούγα και Μυρτάρι Βόνιτσας στο νότιο και Μάζωμα στο δυτικό), γλυκούς και αλμυρούς βάλτους, υγρολίβαδα, παραποτάμια δάση, περιοδικά πλημμυριζόμενες εκτάσεις με καλαμώνες, τυρφώνες, λόφους με φρύγανα και δάση ήμερης βελανιδιάς, καθώς και γεωργικές καλλιέργειες και μικρούς οικισμούς.

Εξέχουσα θέση στον πλούτο του Αμβρακικού έχει η ορνιθοπανίδα. Πιο συγκεκριμένα στην περιοχή του Αμβρακικού έχουν παρατηρηθεί διακόσια ενενήντα ένα (291) διαφορετικά είδη πουλιών (Ζόγκαρης και συνεργάτες υπό δημοσίευση) εκ των οποίων τουλάχιστον διακόσια είκοσι (220) είδη απαντώνται κανονικά κάθε χρόνο και τουλάχιστον εβδομήντα πέντε (75) είδη περιλαμβάνονται στον κατάλογο των απειλούμενων (ANNEX I) της οδηγίας 79/409 της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Για πολλά είδη υδροβίων οι λιμνοθάλασσες της περιοχής αποτελούν κυρίαρχους χώρους διατροφής τους κατά την χειμερινή περίοδο. Στον Αμβρακικό έχουν καταγραφεί κατά την πρόσφατη δεκαετία οι μεγαλύτεροι διαχειμάζοντες πληθυσμοί παπιών σε σύγκριση με άλλους μεγάλους ελληνικούς υγρότοπους. Για αρκετά υδρόβια και παρυδάτια, ακόμη και για ορισμένα που απειλούνται έντονα, όπως η χαλκόκοτα, η χουλιανομούτα, ο αργυροπελεκάνος και η βαλτόπαπια, οι βαλτώδεις εκτάσεις παρέχουν σημαντικά πεδία φωλιάσματος. Τέλος, δεκάδες είδη στηρίζουν την κοπιώδη μεταναστευτική τους περιπέτεια στον τροφικό τους ανεφοδιασμό που απολαμβάνουν από το υδροτοπικό οικοσύστημα της περιοχής. Για τους παραπάνω λόγους η περιοχή έχει ενταχθεί στο δίκτυο NATURA των προστατευόμενων περιοχών της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Τέλος η ενότητα των υδροτοπικών περιοχών του Αμβρακικού προστατεύεται από τη διεθνή σύμβαση Ραμσάρ ως υγρότοπος διεθνούς σημασίας, ιδιαίτερα για τη διατήρηση των μεταναστευτικών υδρόβιων και παρυδάτιων πτηνών.



1.1 Είδη μελέτης

Παρακάτω αναφέρονται τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των άγριων πτηνών από τα οποία συλλέχθηκαν εξήντα (60) δείγματα περιττωμάτων και εξετάστηκαν στην παρούσα διπλωματική διατριβή.

- **Κορακοειδή.** Μερικά είδη που ανήκουν στα κορακοειδή είναι η Κάργια: *Corvus monedula*, το Χαβαρόνι: *Corvus frugilegus* και Καρακάξα: *Pica pica*, (<http://67.18.47.148/com/index2/kinigi/text/thiramata.asp>, 2006).

Κάργια (*Corvus monedula*, Linnaeus)



Εικόνα 13. Κάργια (*Corvus monedula*)
(<http://67.18.47.148/com/index2/kinigi/text/thiramata.asp>, 2006)

Περιγραφή. Η κάργια είναι κορακοειδές με μεγάλη διάδοση σε όλη την επικράτεια και συνήθως επιβλαβές αφού συγκεντρώνεται σε μεγάλους αριθμούς και προκαλεί ζημιές τόσο στις ετήσιες καλλιέργειες την περίοδο της σποράς και της συγκομιδής αλλά και σε άλλα πουλιά της περιοχής. Τρέφεται επίσης με κάμπιες και σκαθάρια. Κατασκευάζει τη φωλιά της πάνω σε κλαδιά μεμονωμένων δέντρων ή σε συστάδες (<http://67.18.47.148/com/index2/kinigi/text/thiramata.asp>, 2006).

Καρακάξα (*Pica pica*, Linnaeus)



Εικόνα 14. Καρακάξα (*Pica pica*)

(<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).

Περιγραφή. Η καρακάξα είναι ένα από τα πιο κοινά πουλιά της υπαίθρου αλλά και των πόλεων. Οι αριθμοί της έχουν αυξητικές τάσεις όπως και όλων των κορακοειδών λόγω της μείωσης των κυνηγών που ασχολούνται μαζί τους. Η καρακάξα, έχει μήκος περίπου 41-42 εκατ. Χαρακτηριστικό ασπρόμαυρο πτέρωμα και μια πολύ μακριά μαύρη ουρά που έχει μια μεταλλική πράσινη και μπλε γυαλάδα. Έχει μια χαρακτηριστική πτήση, κυματιστή, γρήγορη με κτυπήματα των φτερών και μικρά εναέρια γλιστρήματα.

Αναπαραγωγή. Τα θηλυκά γεννούν τα αυγά τους σε φωλιά κατασκευασμένη στην κορυφή των δέντρων. Η φωλιά της καρακάξας καλύπτεται από θόλο φτιαγμένο με πλεγμένα κλαδάκια. Τα αυγά είναι πρασινωπά, καφετιά ή ανοικτό μπλε και έχουν καφετιά στίγματα. Το θηλυκό επωάζει τα αυγά για 17 - 18 ημέρες, αν και το αρσενικό μερικές φορές συμμετέχει στην επώαση. Οι νεοσσοί παραμένουν στη φωλιά για 22 - 24 ημέρες. Η οικογένεια παραμένει ενωμένη για αρκετό χρόνο αφότου έχουν αφήσει οι νεοσσοί τη φωλιά.

Τροφή. Οι καρακάξες είναι παμφάγες, σπόροι, φρούτα, σαλιγκάρια, έντομα, αυγά, αλλά και νεκρά ζώα συμπεριλαμβάνονται στο διαιτολόγιό τους (<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).

➤ Κυνηγόπαπια (*Aythya ferina*, Linnaeus)



Εικόνα 15. Κυνηγόπαπια (*Aythya ferina*)

(<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).

Περιγραφή. Ζει στην Κεντρική και Δυτική Ευρώπη και στην Κεντρική Ασία. Μεταναστεύει και περνά το χειμώνα στη Νότια και Δυτική Ευρώπη, Βόρεια και Ανατολική Αφρική και Νότια και Ανατολική Ασία (<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).

Βιότοπος. Φωλιάζει στο έδαφος, κοντά στο νερό, μέσα σε πυκνή βλάστηση, σε μεγάλες λίμνες με νησάκια. Η φωλιά κατασκευάζεται από το θηλυκό και στρώνεται με βλάστηση και πούπουλα.

Αναπαραγωγή. Γεννάει μια φορά το χρόνο 8-10 αβγά χρώματος ανοιχτού πρασινωπού τα οποία επωάζονται μόνο από το θηλυκό για 25 περίπου μέρες. Οι νεοσσοί τρέφονται από το θηλυκό και είναι έτοιμοι να πετάξουν σε 50-55 μέρες.

Τροφή. Τρέφεται με υδρόβια φυτά, ασπόνδυλα, βατράχια, γυρίνους και μικρά ψάρια που αναζητάει κάτω από το νερό, στον πυθμένα των λιμνών κάνοντας καταδύσεις ή σκαλίζει τη λάσπη αναζητώντας σκουλήκια και άλλα ασπόνδυλα. Το γυαλιστερό κοκκινωπό κεφάλι και το γκρισοπράσινο σώμα ξεχωρίζουν στα αρσενικά. Τα θηλυκά είναι γκριζο-καφέ από πάνω, πιο καστανά από κάτω με ασπρουδερό σχήμα στο πρόσωπο (<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).

➤ **Τσικνόπαπια (*Aythya fuligula*, Linnaeus)**



Εικόνα 16. Τσικνόπαπια (*Aythya fuligula*)

(<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).

Περιγραφή. Ζει στην Κεντρική, Βόρεια και Δυτική Ευρώπη και στη Βόρεια και Ανατολική Ασία. Μεταναστεύει και περνά το χειμώνα στη Νότια και Δυτική Ευρώπη, Βόρεια και Ανατολική Αφρική και Νότια και Ανατολική Ασία.

Βιότοπος. Φωλιάζει σε μικρά νησάκια στο έδαφος, κοντά στο νερό, σε ανοιχτές και βαθιές λίμνες γλυκού νερού, και σε τεχνητές λίμνες. Η φωλιά κατασκευάζεται από το θηλυκό και στρώνεται με βλάστηση και πούπουλα (<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).

Αναπαραγωγή. Γεννάει μια φορά το χρόνο 8-11 αβγά χρώματος ανοιχτού πράσινο-γκρι. Τα αβγά επωάζονται μόνο από το θηλυκό για 25 περίπου μέρες. Οι νεοσσοί τρέφονται από το θηλυκό και είναι έτοιμοι να πετάξουν σε 40-45 μέρες.

Τροφή. Τρέφεται με υδρόβια φυτά, ασπόνδυλα, βατράχια, γυρίνους και μικρά ψάρια που αναζητάει κάτω από το νερό, στον πυθμένα των λιμνών, κάνοντας καταδύσεις. Οι νεοσσοί τρέφονται κυρίως με ασπόνδυλα και έντομα. Η μαύρη ράχη και το λοφίο είναι τα χαρακτηριστικά του αρσενικού. Το θηλυκό έχει πολύ μικρό λοφίο και άσπρο στη βάση του ράμφους (<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).

➤ Πρασινοκέφαλη (*Anas platyrhynchos* Linnaeus)



Εικόνα 17. Πρασινοκέφαλη (*Anas platyrhynchos*)
(<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).

Περιγραφή. Ζει στους περισσότερους υγρότοπους του Βορείου ημισφαιρίου. Είναι μεταναστευτικό είδος, αλλά υπάρχουν κάποιοι πληθυσμοί που παραμένουν στη χώρα μας όλο το χρόνο.

Βιότοπος. Προτιμάει γλυκά νερά με αναπτυγμένη βλάστηση για κάλυψη. Το θηλυκό φτιάχνει τη φωλιά στο έδαφος, συνήθως κοντά στο νερό. Στρώνει τη φωλιά με φύλλα, ξερά χόρτα και πούπουλα που βγάζει από το σώμα του.

Αναπαραγωγή. Γεννάει μια φορά το χρόνο 9-13 αβγά, χρώματος ανοιχτού κιτρινοπράσινου, τα οποία επωάζει το θηλυκό για 27-28 ημέρες. Πολλά αβγά στην ίδια φωλιά δείχνουν ότι τη χρησιμοποιούν δύο θηλυκά. Διαχειμάζει στη Νότια Ευρώπη και Βόρεια Αφρική.

Τροφή. Τρέφεται με μεγάλη ποικιλία φυτικών ειδών και ασπόνδυλων που αναζητάει στα ρηχά βυθίζοντας το κεφάλι της κάτω από την επιφάνεια του νερού ή ψάχνοντας στην επιφάνεια. Τη νύχτα βγαίνει σε υγρά λιβάδια για αναζήτηση βλάστησης και σπόρων. Το αρσενικό έχει γυαλιστερό πράσινο κεφάλι, κίτρινο ράμφος, σκούρο καστανό στήθος και ανοικτό γκριζο το κάτω μέρος. Το θηλυκό είναι καστανόξανθο, αλλά χωρίς ιδιαίτερα χρώματα
(<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).



➤ **Χουλιάροπαπια (*Anas clypeata*, Linnaeus)**



Εικόνα 18. Χουλιάροπαπια (*Anas clypeata*)

(<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).

Περιγραφή. Ζει στη Βόρεια και Κεντρική Ευρώπη και στη Βόρεια Ασία, ενώ περνά το χειμώνα στη Νότια και Δυτική Ευρώπη, Βόρεια Αφρική και Νότια Ασία.

Αναπαραγωγή. Αναπαράγεται σε μικρές ρηχές λίμνες, σε ρηχούς βάλτους και σε υγρολίβαδα με αρκετή βλάστηση. Το θηλυκό χτίζει τη φωλιά στο έδαφος, συνήθως κοντά στο νερό και τη στρώνει με βλάστηση και πούπουλα που βγάζει από το σώμα του. Γεννάει μια φορά το χρόνο 9-13 αβγά, χρώματος ανοιχτού κιτρινοπράσινου, τα οποία επωάζει για 26-27 μέρες. Οι νεοσσοί μπορούν να πετάξουν μετά από 40-45 ημέρες.

Τροφή. Τρέφεται με έντομα και ασπόνδυλα καθώς και φυτικά είδη που αναζητάει στα ρηχά βυθίζοντας το κεφάλι της κάτω από την επιφάνεια του νερού ή ψάχνοντας στην επιφάνεια. Ξεχωρίζει εύκολα από το παράξενο ράμφος που είναι ορατό από απόσταση. Το αρσενικό έχει καστανοκόκκινη κοιλιά. Ο πράσινος «καθρέπτης» (δευτερεύοντα πτητικά φτερά) ξεχωρίζει το θηλυκό από τα θηλυκά της Πρασινοκέφαλης (<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).

➤ **Κικίρι (*Anas crecca*)**



Εικόνα 18. Κικίρι (*Anas crecca*) (<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).

Περιγραφή. Ζει στην Κεντρική και Βόρεια Ευρώπη και Ασία, είναι είδος μεταναστευτικό, μετακινείται μετά το τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου νοτιότερα στις εύκρατες ζώνες της Ευρώπης και Ασίας και στη Βόρεια και Δυτική Αφρική για να ξεχειμωνιάσει.

Αναπαραγωγή. Η αναπαραγωγική περίοδος ξεκινάει από τα τέλη Μαρτίου ως μέσα Μαΐου. Προτιμά απομονωμένες μικρές λίμνες, λιμνοθάλασσες, ποταμάκια με χαμηλή ταχύτητα ροής του νερού αλλά και μεγάλα υγροτοπικά συστήματα και κοιλάδες με δασόβια βλάστηση. Γεννά 8-11 αβγά τα οποία επωάζει μόνο το θηλυκό για 21-23 ημέρες.

Τροφή. Είδος παμφάγο. Χρησιμοποιεί διάφορες μεθόδους για να τραφεί που εξαρτώνται από το βιότοπο, την εποχή, την ώρα της ημέρας και το φύλο. Μπορεί να φιλτράρουν τη λάσπη περπατώντας στις όχθες λιμνών ή ποταμών, να κολυμπούν με το κεφάλι βυθισμένο μέσα στο νερό, να επιλέγουν τροφή από την επιφάνεια του νερού, ενώ σπάνια να καταδύονται. Είναι η μικρότερη αγριόπαπια. Έχει χαρακτηριστικό σχήμα στο κεφάλι, τα δευτερεύοντα πτητικά φτερά (καθρέπτης) στο αρσενικό είναι πράσινα και κάτω από την ουρά είναι κίτρινα. Το θηλυκό θυμίζει μικρογραφία πρασινοκέφαλης έχει όμως πράσινο «καθρέπτη» με μαύρο πλαίσιο. Τα κικίρια πετούν συχνά σε μεγάλα πυκνά κοπάδια, και σπάνια σε σχήμα V (<http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006).



III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός πειράματος

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν επίσημα δεδομένα επιδημιολογικών ερευνών κατανομής του γένους *Salmonella spp* και του γένους *Clostridium perfringens* στην περιοχή του Αμβρακικού κόλπου. Για τον λόγο αυτό η συγκεκριμένη μελέτη επικεντρώθηκε στη χαρτογράφηση των προαναφερθέντων βακτηρίων τα οποία υπεισέρχονται στο ανοιχτό οικοσύστημα του Αμβρακικού κόλπου από τα περιττώματα των άγριων πτηνών που διαβιούν στην περιοχή.

Σκοπός του πειράματος είναι να διαπιστωθεί πόσο συμμετέχουν στη μικροβιακή βιοποικιλότητα της περιοχής του Αμβρακικού κόλπου τα άγρια και υδρόβια πτηνά σε σχέση με την ύπαρξη στο οικοσύστημα δύο παθογόνων μικροβίων, της *Salmonella spp* και του *C. perfringens* και σε ποιές περιόδους η παρουσία τους είναι εντονότερη.

2. Υλικά και μέθοδοι απομόνωσης για το γένος *Salmonella spp.*

2.1 Απαιτούμενα υλικά

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

- 1) Υγρό ομογενοποίησης του δείγματος.
- 2) Σιφόνια 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) Μεταλλικά στατό για γυάλινους σωλήνες.
- 6) Αποστειρωμένες μεταλλικές λαβίδες.
- 7) Τρυβλία petri.
- 8) Στείρες ευρύστομες φιάλες ή στείρα ποτήρια ζέσης.
- 9) Ζυγός ακριβείας (Mark BEL ENGINEERING).
- 10) Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη πλάκα RCT basic (KIKA LABORTECHNIK).
- 11) Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (varipette 10-100μl και 100-1000μl).



- 12) Πλαστικά ρύγχη μιας χρήσης αποστειρωμένα, κίτρινα 10-100μl και μπλε 100-1000μl για τις παραπάνω πιπέτες.
- 13) Φυγόκεντρος.
- 14) Ξηρός κλίβανος.
- 15) Υδατόλουτρο.
- 16) Κλίβανος αερόβιας και αναερόβιας επώασης (MEMMERT)
- 17) Αυτόκαυστο Sterilizer SE 510 (V yamato).
- 18) Buffered Peptone Water (Y.1).
- 19) Rappaport–Vassiliadis Soya Peptone Broth (Y.2).
- 20) Brilliant Lactose Green Agar (Y.3).
- 21) Xylose Lysine Desoxycholate Agar (Y.4).
- 22) Triple Sugar Iron Agar (Y.5).
- 23) Brain Heart Infusion Broth (Y.6)
- 24) MakConkey Agar (Y.7).
- 25) Κεκλιμένο Nutrient Agar (Y.8)

Τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται στην ψύξη μέχρι το πέρας των εξετάσεων, οι οποίες ολοκληρώνονται συνήθως μέσα σε 48 ώρες μετά τη δειγματοληψία.

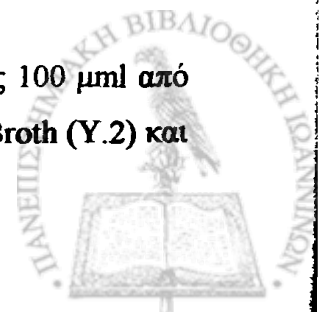
2.2 Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία περιλαμβάνει την λήψη εξήντα (60) δειγμάτων κοπράνων άγριων υδρόβιων πτηνών. Η συλλογή των κοπράνων έγινε με τη βοήθεια αποστειρωμένων βαμβακοφόρων στυλεών και τα οποία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς αποστειρωμένους περιέκτες (δηλαδή λαμβάνονται δείγματα κοπράνων από πρόσφατη κένωση) (Δημητρακόπουλος, 1994).

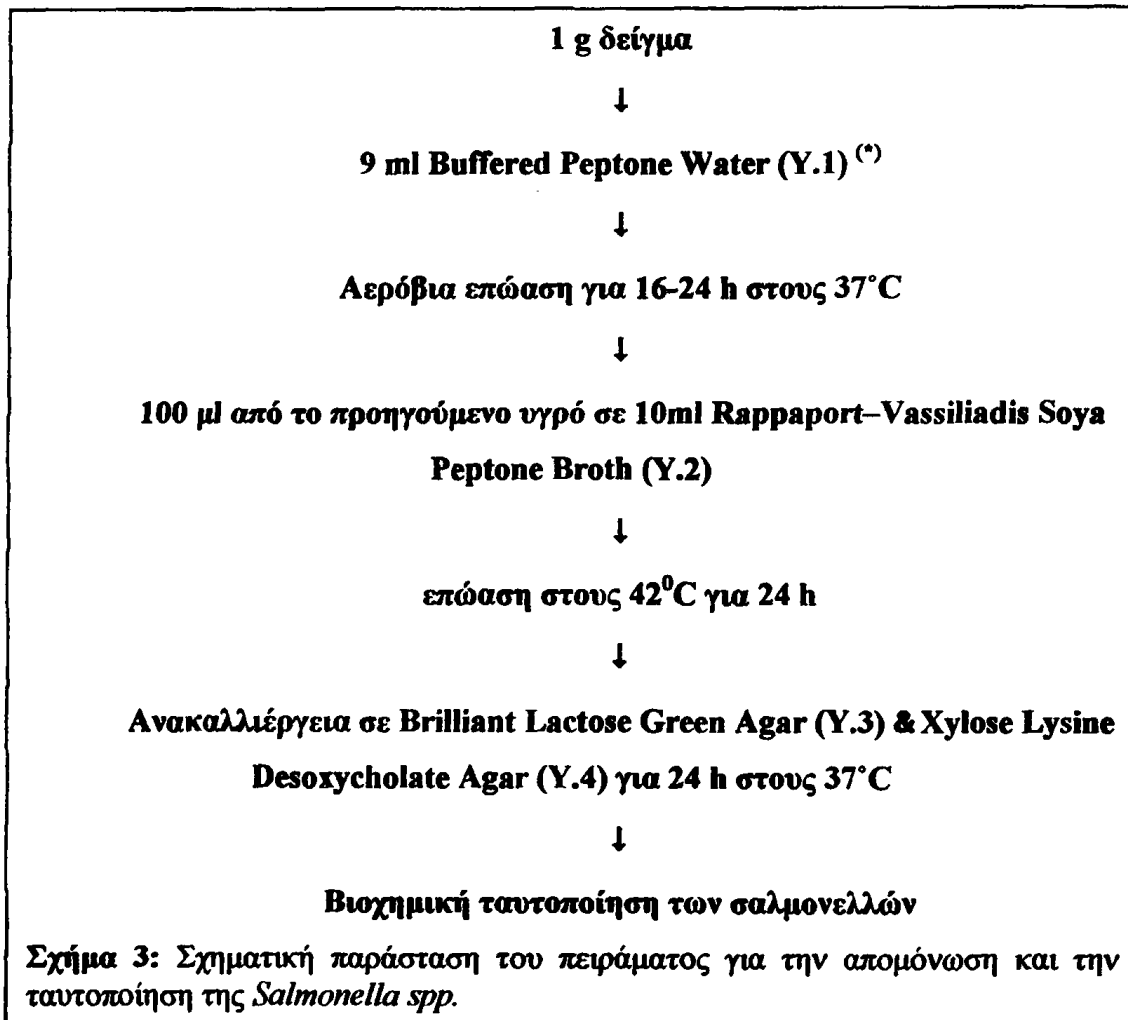
2.3 Εξέταση των δειγμάτων στο εργαστήριο - Μέθοδος απομόνωσης του γένους *Salmonella spp.*

Από κάθε δείγμα κοπράνων λαμβάνεται αντιπροσωπευτικά ποσότητα του 1g και μεταφέρεται σε σωλήνα που περιέχει 9 ml Buffered Peptone Water (Y.1). Όλοι οι σωλήνες τοποθετούνται σε μεταλλικό στατό και επιάζονται αερόβια στους 37°C για 16-24h σε κλίβανο αερόβιας επώασης.

Μετά το πέρας των 24 ωρών πραγματοποιείται ενοφθαλμισμός 100 μl από το προηγούμενο υγρό σε 10ml Rappaport – Vassiliadis Soya Peptone Broth (Y.2) και



επώαση στους 42°C για 24 h. Ακολούθως γίνεται ενοφθαλμισμός με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης 0,3 ml από το προαναφερόμενο υγρό σε τρυβλία που περιέχουν Brilliant Lactose Green Agar (Y.3) και Xylose Lysine Desoxycholate Agar (Y.4) και επώαση των τρυβλίων για 18–24 h στους 37°C. Συλλέγονται 5-10 τυπικές αποικίες του γένους για περαιτέρω βιοχημικές αναλύσεις.



^(*) Αερόβια επώαση του Buffered Peptone Water για 30 min. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ενοφθαλμισμός στα εξής υποστρώματα: Egg Yolk - Columbia αιματούχο (αναερόβια), MacConkey Agar, Columbia, TCBS, Baid Parker, MRS.

Η βιοχημική ταυτοποίηση του γένους *Salmonella spp* περιλαμβάνει τις ακόλουθες δοκιμές :

- Ανάπτυξη σε Triple Sugar Iron Agar (Y.5) όπου ελέγχεται η ζύμωση της γλυκόζης και η παραγωγή H₂S.
- Υδρόλυση της ουρίας (B.Δ.1).



- Αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης (B.Δ.2).
- Παραγωγή της Β – γαλακτοσιδάσης (B.Δ.3).
- Παραγωγή της ακετοΐνης με την αντίδραση Voges Proskauer (B.Δ.4).
- Παραγωγή ινδόλης (B.Δ.5).

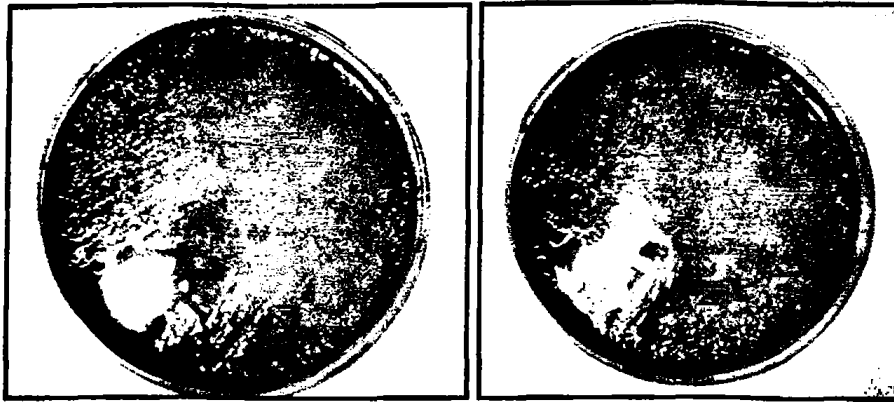
Πίνακας 11. Βιοχημική ταυτοποίηση του γένους *Salmonella spp.*

Triple Sugar Iron Agar (ζύμωση γλυκόζης και παραγωγή H ₂ S)	+
Υδρόλυση ουρίας	-
Αποκαρβοξυλίωση λυσίνης	+
β-γαλακτοσιδάση	-
Αντίδραση Voges-Proskauer	-
Αντίδραση ινδόλης	-

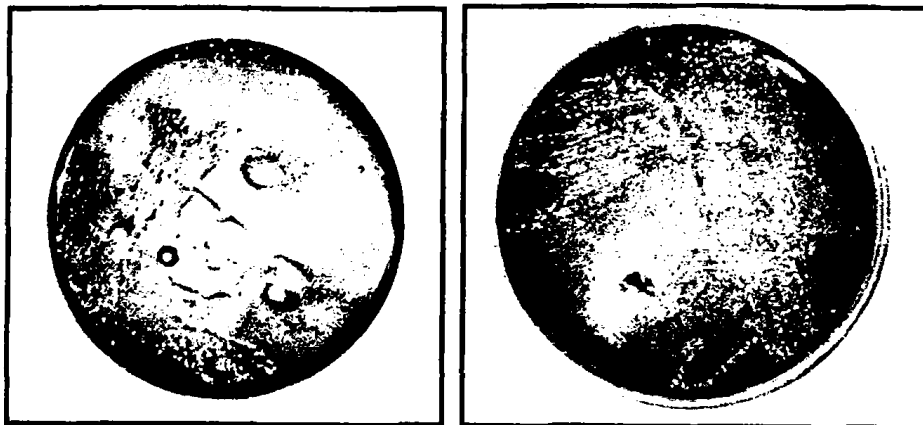
Τέλος όλες οι αποικίες που χαρακτηρίζονται ως *Salmonella spp* τοποθετούνται σε *Brain Heart Infusion Broth (BHIB)* (Y.6) και διατηρούνται στην κατάψυξη. Ακολούθως οι αποικίες μεταφέρθηκαν σε Κέντρα Αναφοράς για ταυτοποίηση του γένους *Salmonella* όπου θα πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες ορολογικές δοκιμές:

- MacConkey Agar (Y.7) για καθαρότητα
- Κεκλιμένο Nutrient Agar (Y.8) για οροσυγκολλήσεις
- Πολυδύναμο αντιορό O
- Πολυδύναμο αντιορό H
- Αντιορό V_i για (*S. typhi*)
- Επιβεβαίωση ορολογικής ομάδας (πχ. 04 ,09)

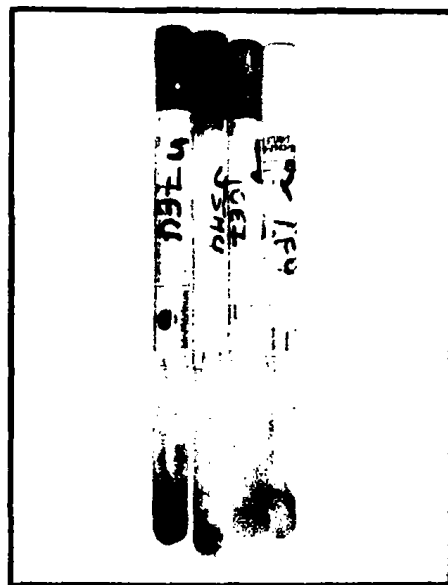




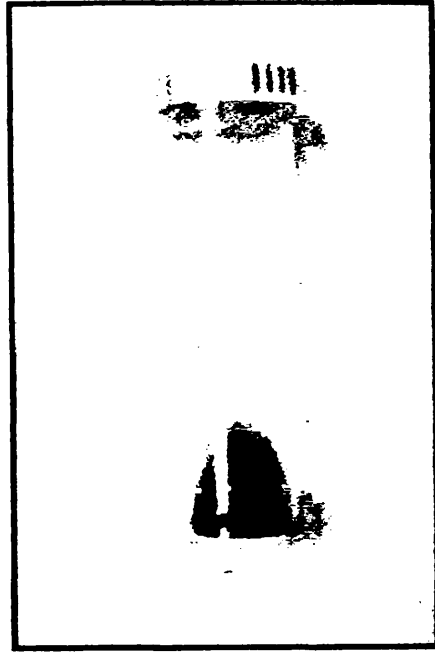
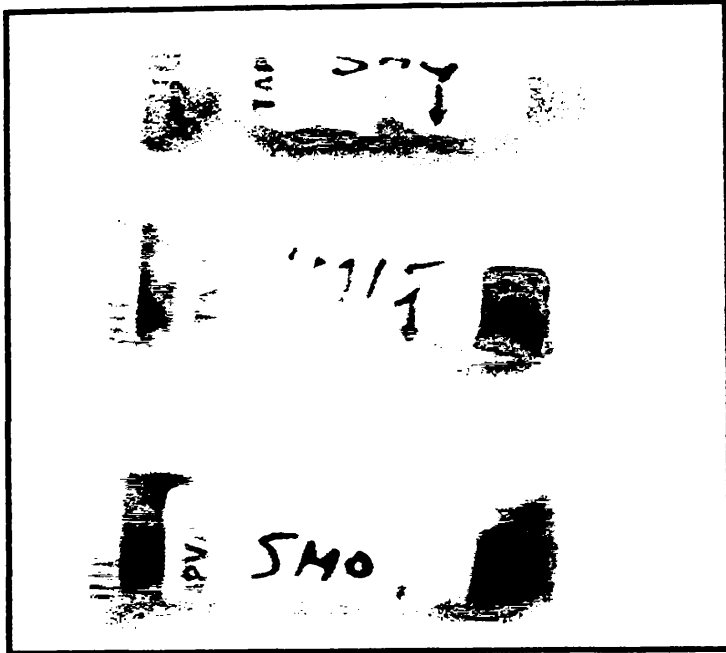
Εικόνες 19, 20. Αποικίες *Salmonella* σε τρυβλίο petri που περιέχει στερεό θρεπτικό υπόστρωμα BPLS agar.



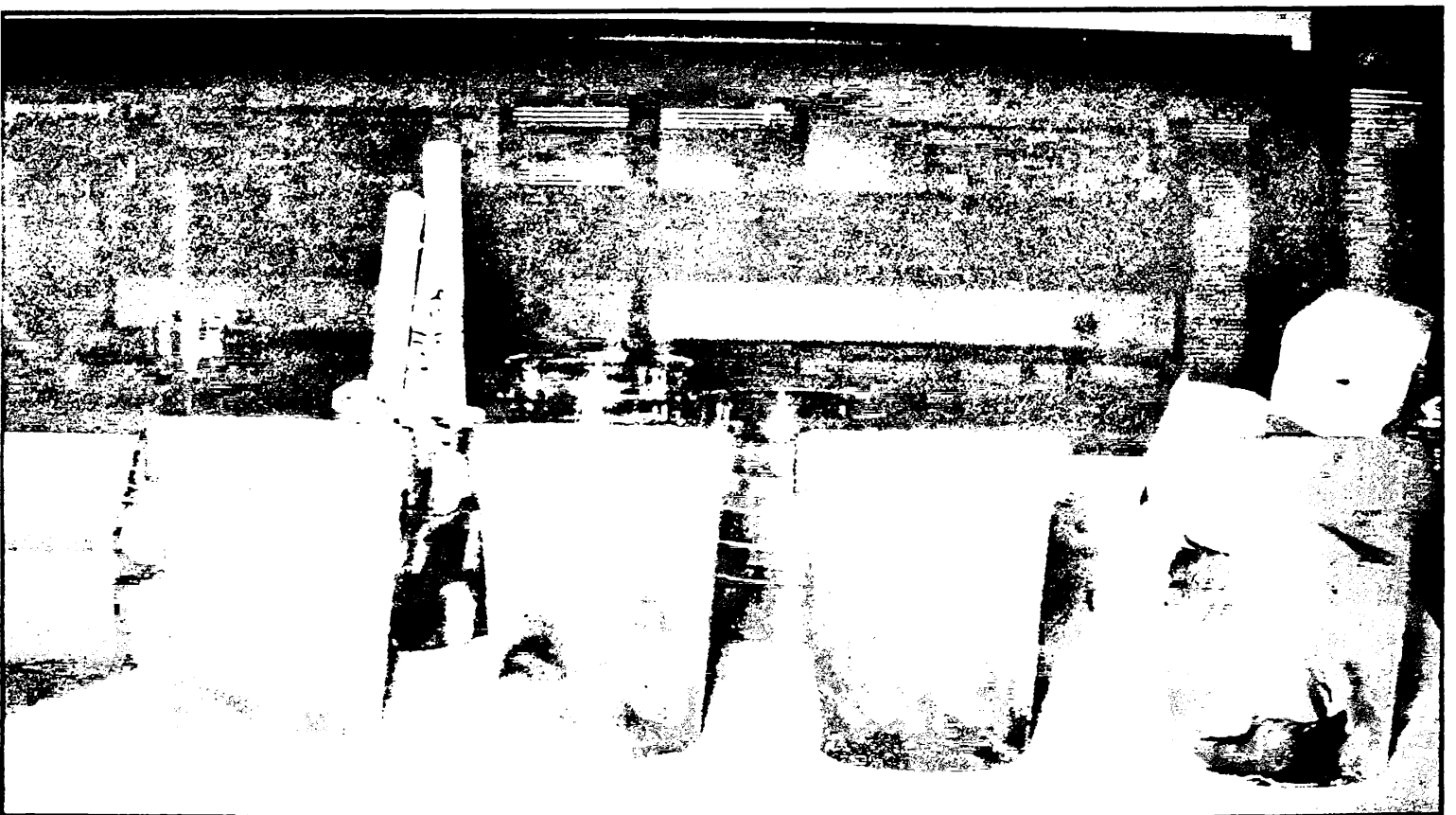
Εικόνες 21, 22. Αποικίες *Salmonella* σε τρυβλίο petri που περιέχει στερεό θρεπτικό υπόστρωμα XLD agar.



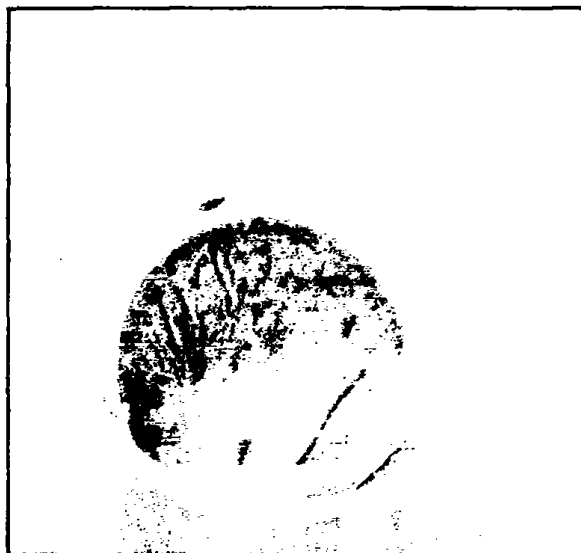
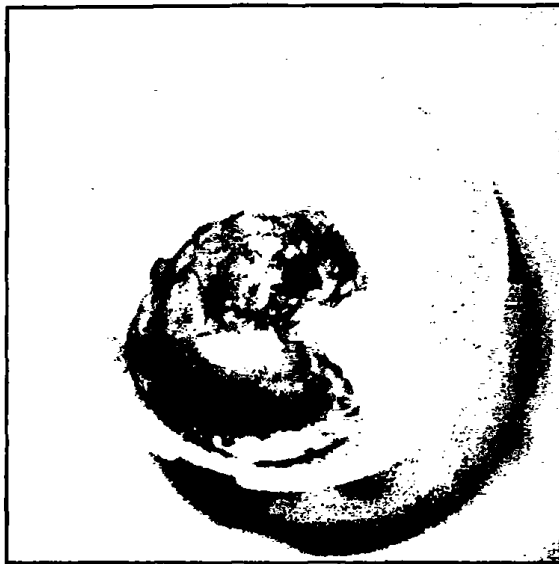
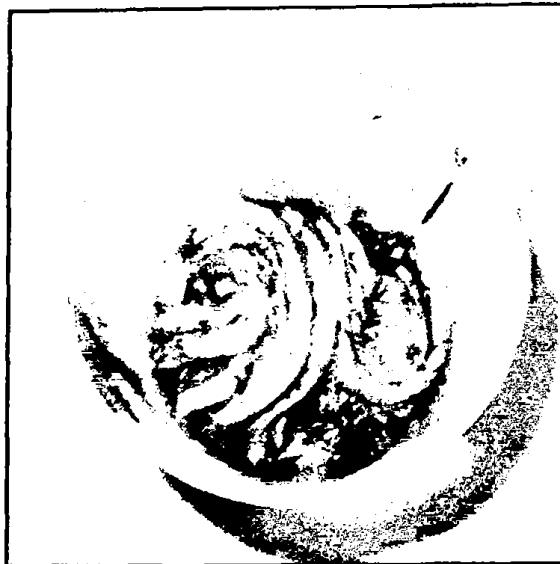
Εικόνα 23. Συλλογή των περιττωμάτων των πτηνών με τη χρήση αποστειρωμένων βαμβακοφόρων στυλεών.



Εικόνα 24, 25. Συλλογή των περιττωμάτων των πτηνών με τη χρήση αποστειρωμένων ουροσυλλεκτών.



Εικόνα 26. Συλλογή πτερώματος, παχέος-λεπτού εντέρου και περιττωμάτων των πτηνών με τη γούση αποστειρωμένων ουροσυλλεκτών.



Εικόνες 27, 28, 29, 30. Συλλογή παχέος-λεπτού εντέρου, πτερώματος και περιττωμάτων των πτηνών με τη χρήση αποστειρωμένων ουροσυλλεκτών.

3. Υλικά και μέθοδος απομόνωσης για το είδος *Clostridium perfringens*

3.1 Απαιτούμενα υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του είδους *C. perfringens* είναι τα παρακάτω :

1. Υγρό ομογενοποίησης του δείγματος.
2. Σιφόνια 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 ζέσης.

9. Ζυγός ακριβείας (Mark BEL ENGINEERING).
10. Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη πλακα RCT basic (KIKALABORTECHNIK).
11. Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (varipette 10-100μl και 100-1000 μl).
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 (U 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.

3.2 Δειγματοληψία

Επίσης, η δειγματοληψία περιλαμβάνει την λήψη εξήντα (60) δειγμάτων κοπράνων άγριων υδρόβιων πτηνών. Η συλλογή των κοπράνων έγινε με τη βοήθεια αποστειρωμένων βαμβακοφόρων στυλεών και τα οποία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς αποστειρωμένους περιέκτες.

3.3 Μέθοδος απομόνωσης και ταυτοποίησης για το είδος *C. perfringens*:

Η ερευνητική ομάδα για την καταμέτρηση του είδους *C. perfringens* έκανε χρήση στους 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 μελέτη 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 αραιώση δείγματος σε υλικό L.S. broth οι εξής caratterήρες :

Θόλωση: Αναγνωρίζεται από την απώλεια στους διαύγειας του θρεπτικού υλικού, λόγω ζύμωσης στους λακτόζης. Παραγωγή H_2S : Αναγνωρίζεται με την ύπαρξη μαύρου χρώματος στον πυθμένα του γυάλινου σωλήνα ή σε όλη τη μάζα του υγρού λόγω παραγωγής H_2S . Παραγωγή αερίου: Αναγνωρίζεται με την ύπαρξη φυσαλίδων στο εσωτερικό του σωληνάριου Durham και απόθεση 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 την αντίδραση της ζύμωσης της λακτόζης θετική.

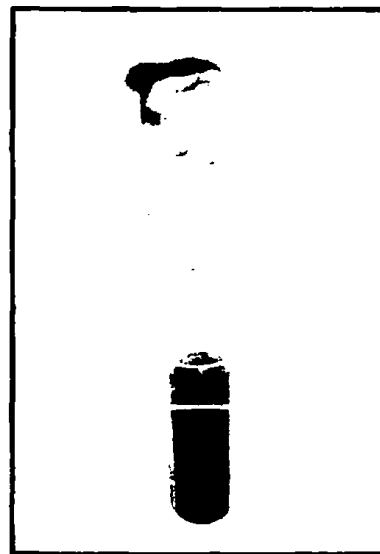
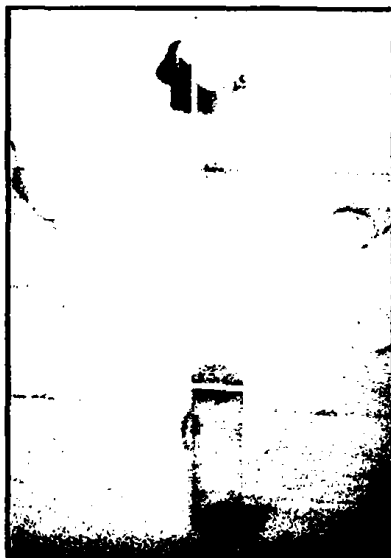
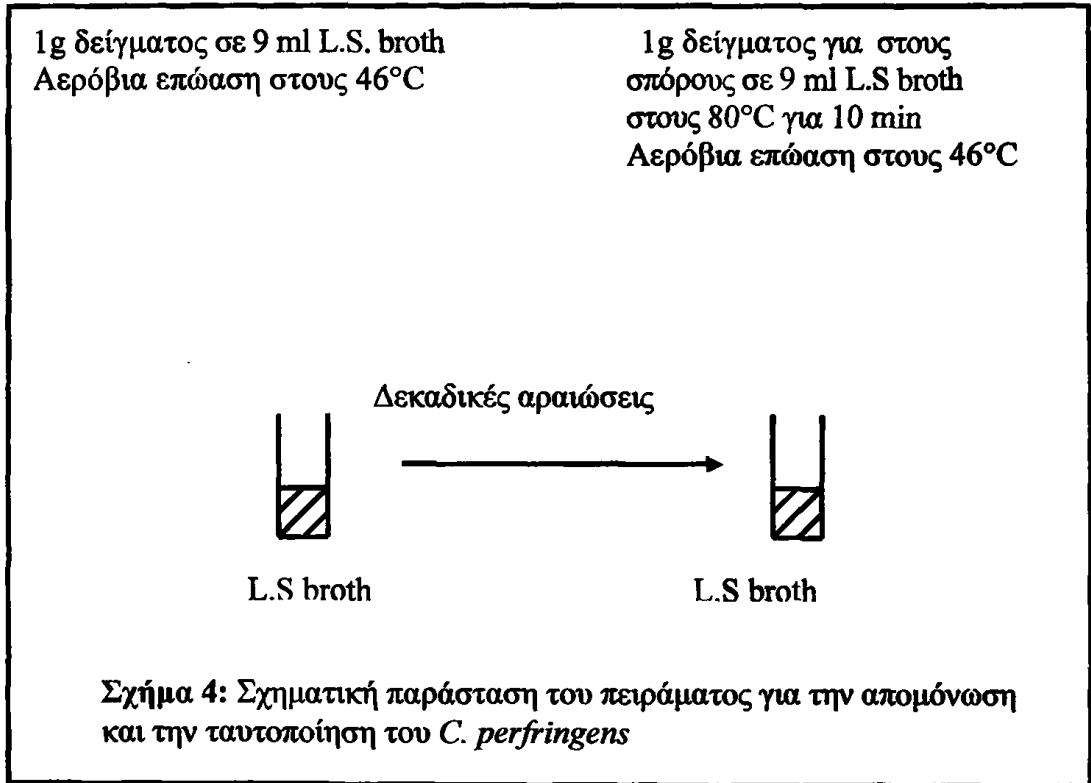
Η κάθε αραιώση του εξεταζόμενου δείγματος σε υλικό L.S. κρίνεται θετική ως προς την ύπαρξη στελεχών του είδους *C. perfringens* αν συνυπάρχει θολερότητα, παραγωγή H_2S , σχηματισμός αερίου και σχηματισμός ιζήματος. Το ίδιο ισχύει και για την ανάδειξη θετικού ή όχι αποτελέσματος για την ύπαρξη σπόρων 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 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 αναπτυχθέντων 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:

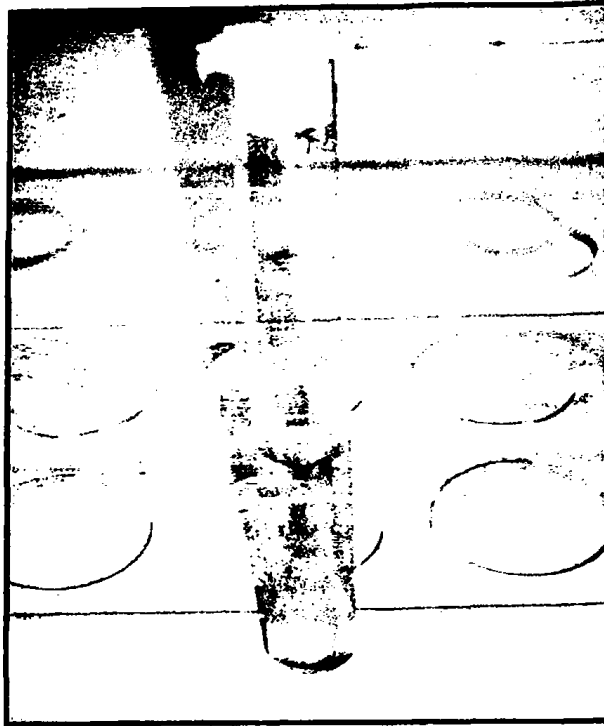


- Έλεγχος αερόβιας και αναερόβιας ανάπτυξης.
- Έλεγχος κινητικότητας (Motility-nitrate medium).
- Ζύμωση λακτόζης (Lactose gelatine medium).
- Έλεγχος αντίδρασης Nagler (παραγωγή α-τοξίνης).

Η σχηματική παράσταση του πειράματος παρατίθεται παρακάτω :



Εικόνες 31, 32. Αποικίες του *C. perfringens* σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει υγρό εκλεκτικό υπόστρωμα L.S broth.



Εικόνα 33. Μη ύπαρξη αποικιών του *C. perfringens* σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει υγρό εκλεκτικό υπόστρωμα L.S broth.

4. Υποστρώματα

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των παθογόνων βακτηρίων των *Salmonella spp* είναι τα παρακάτω:

► Πεπτονόχο 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.

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 μία ημέρα.

➤ **Rappaport-Vassiliadis Medium (Y.2)**

Βάση ζωμού:

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

Magnesium chloride solution :

MgCl ₂ ·6H ₂ 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 ένα 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°C για 15 min. Διατηρείται στο ψυγείο και πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα σε χρονικό διάστημα ενός μηνός. Αυτό το μέσο πρέπει να γίνει από τα μεμονωμένα συστατικά του. Η χρήση των εμπορικά διαθέσιμων αφυδατωμένων μέσων δεν συστήνεται.

➤ **Briliant Lactose Green Agar (BPLS) (Y.3)**

Yeast Extract	3,0g
Beef Extract	5,0g
Peptone (Polypeptone)	10,0g
Disodium Hydrogen Phosphate	1,0g
Sodium di-Hydrogen Phosphate	0,6g
Lactose	10,0g
Saccharose	10,0g
Phenol Red	0,09g
Briliant Green	0,0047g
Agar	12,0g
D.W. q.s.	1000,0ml

Παρασκευή: Τα συστατικά του υποστρώματος διαλύονται με βρασμό, ρυθμίζεται το pH (pH=6,9), ψύχεται στους 50°C και κατανέμεται σε τρυβλία petri. Δεν αποστειρώνεται

Χρήση: Για την απομόνωση *Salmonella*.



➤ **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	000ml

Παρασκευή: Θέρμανση με αναταραχή ακριβώς μέχρι το σημείο βρασμού. 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 μία ημέρα.

➤ **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°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.

► Brain heart infusion Broth (BHI Broth) (Y.6)

Χρησιμοποιείται έτοιμο του εμπορίου και ακολουθούνται οι οδηγίες του παρασκευαστή οίκου. Ρυθμίζεται το pH, ($\text{pH}: 7,4$), κατανέμεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστειρώνεται στους $121^\circ\text{C}/15$ λεπτά.

3.Blood Agar (Y.10)

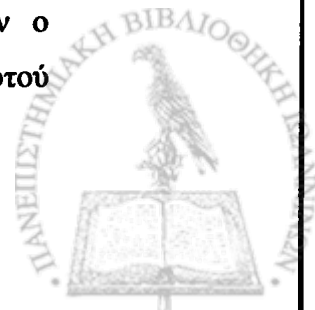
pH: $7,2 \pm 0,2$

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 πόμα, η οποία περιέχει γυάλινα σφαιρίδια. Η φιάλη αναταράσσεται δυνατά για να καταστραφούν τα πλέγματα ινικής του αίματος.

Παρασκευή: Τα συστατικά του υποστρώματος A 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 $45-50^\circ\text{C}$ 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.



➤ **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 O₂ 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 (Na₂S₂O₂) 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.

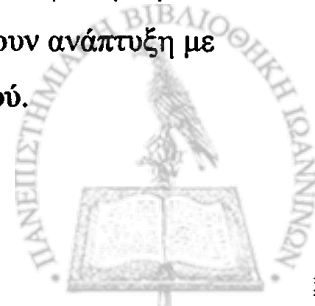
5. Βιοχημικές δοκιμές

Οι βιοχημικές δοκιμές που θα χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella spp* και *C. perfringens* είναι οι ακόλουθες.

5.1 Δοκιμή κινητικότητας (motility test) (B.Δ.6)

Δοκιμαστικοί σωλήνες, οι οποίοι 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 καλλιιεργειών 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.

5.2 Δοκιμή ινδόλης (indole test) (B.Δ.5)

Με τη δοκιμή αυτή διερευνάται ή 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 επιάζονται 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.

5.3 Δοκιμή ερυθρού του μεθυλίου (methyl red test ή mr 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, οπότε 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.

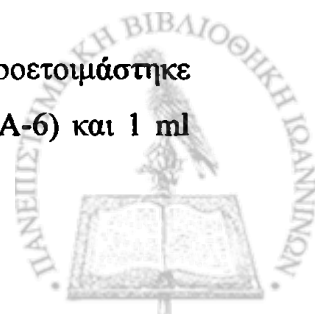
5.4 Δοκιμή Voges - Proskauer ή vp (ανίχνευση ακετυλομεθυλοκαρβινόλης ή ακετοΐνης) (B.Δ.4)

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 αλκάλειου 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 *n*-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 ΚΟΗ. Γίνεται καλή ανάμιξη και εξέταση μετά από 1 και 4 ώρες. Η αντίδραση είναι θετική όταν αναπτυχθεί ανοικτό κόκκινο χρώμα (eosin - pink).

5.5 Δοκιμή χρησιμοποίησης των κιτρικών αλάτων (citrate utilization test)

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 1^η: Ενοφθαλμίζονται σωλήνες με Koser's Citrate Medium (B-40a) 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 2^η: 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.

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 24^η και 48^η 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 FeSO₄ και 0,1ml υδατικού διαλύματος 40% KOH.

5.7 Δοκιμή παραγωγής ουρεάσης (urease test) (B.Δ.1)

α) Μέθοδος για υγρά υποστρώματα :

Γίνεται ενοφθαλμισμός υποστρώματος SSR Medium (B-94) ή Christensen's Urea Broth (B-19), το οποίο επώαζεται 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 :

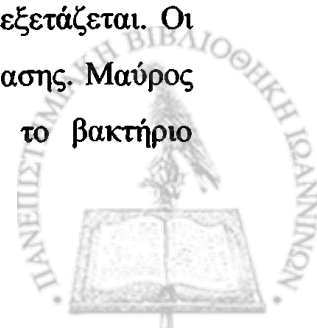
Γίνεται ενοφθαλμισμός στην κεκλιμένη επιφάνεια του υποστρώματος Christensen's Urea Medium(B-19), το οποίο επώαζεται στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου που εξετάζεται. Οι σωλήνες με το υπόστρωμα εξετάζονται ύστερα από 4 ώρες και καθημερινώς επί 5 ημέρες. Θετική είναι η δοκιμή όταν οι σωλήνες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

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 1^η: Ενοφθαλμίζεται υπόστρωμα Lead Acetate Agar. Το υπόστρωμα αυτό ενοφθαλμίζεται με ακίδα τόσο στο βυθό όσο και στην κεκλιμένη επιφάνεια και επώαζεται στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου που εξετάζεται. Οι σωλήνες ελέγχονται τη 18^η και 24^η ώρα και την 44^η-48^η 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 2^η: 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 34. Δοκιμή παραγωγής υδρόθειου σε υπόστρωμα Triple Sugar Iron Agar.

5.9 Δοκιμή β-γαλακτοσιδάσης (ONPG test) (B.Δ.3)

Ενοφθαλμίζεται ζυμός 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.

5.10 Αντίδραση Nagler (Δοκιμή αναστολής της λεκιθινάσης) (B.Δ.8)

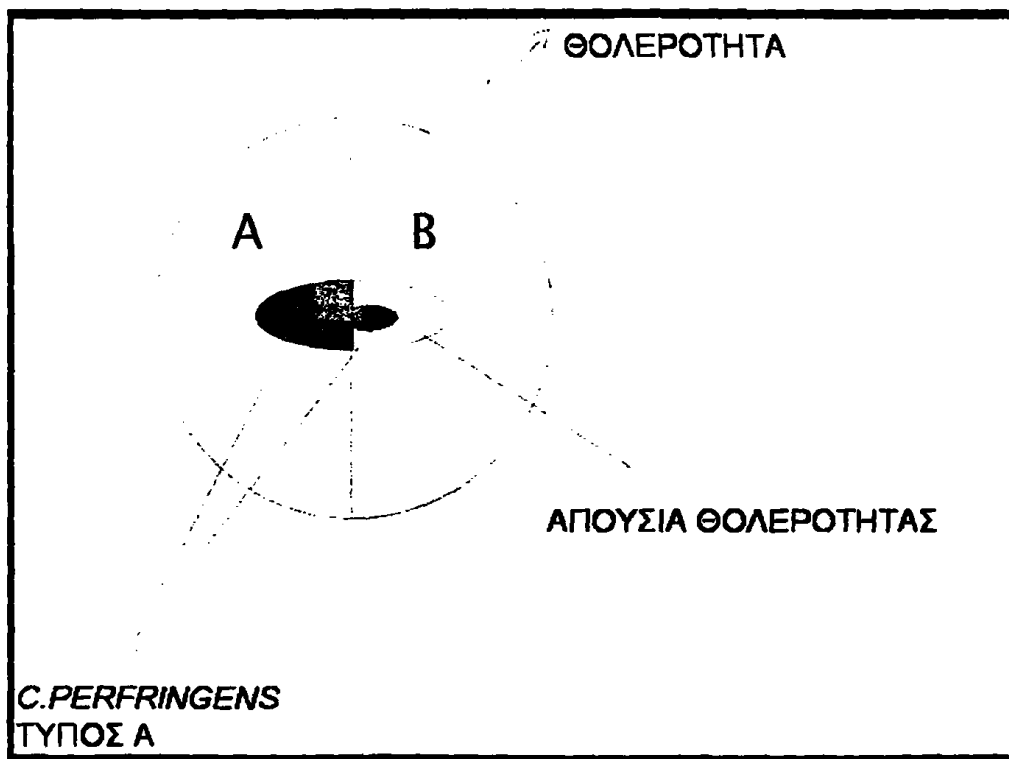


Το *C. perfringens* ανήκει στην ομάδα των κλωστηριδίων όπου η παραγωγή λεκιθινάσης αναστέλλεται παρουσία αντιορού της α-τοξίνης του *C. perfringens*.

Τεχνική

Χρησιμοποιείται το υπόστρωμα Egg Yolk Agar. Η μισή επιφάνεια EYA 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 37°C. 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.



Σχήμα 5: Αντίδραση Nagler A: επίστρωση του *C. perfringens* χωρίς αντιορό (αντιτοξίνη), B: επίστρωση του *C. perfringens* με αντιορό. Παρατηρείται απουσία θολερότητας στη θέση του τρυβλίου που έχει τοποθετηθεί αντιορός (Βόϊδαρου, 2002).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μελέτη των δειγμάτων των άγριων πτηνών και η επεξεργασία των δεδομένων και των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από αυτά οδήγησε στη δημιουργία πινάκων και ιστογραμμάτων που παρατίθενται παρακάτω. Το πρόγραμμα Excel του Microsoft Office των Windows χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των δεδομένων αυτών και την κατάταξη των αποτελεσμάτων ανάλογα με το είδος του ξενιστή.



Πίνακας 12

Αποτελέσματα απομόνωσης μικροβίων από δείγματα κοπράνων
από άγρια πτηνά του Αμβρακικού Κόλπου.

Α/Α	Δείγμα (προέλευσης)	<i>C. perfringens</i>				Σπόροι	<i>Salmonella sp.</i>
		L. S ζωμός					
		Βλαστικές μορφές					
		10 ⁻¹ αραίωση	10 ⁻² αραίωση	10 ⁻³ αραίωση			
1	Ομάδα Α	+	-	-	+	+	
2	Ομάδα Α	-	-	-	+	+	
3	Ομάδα Α	+	+	+	-	-	
4	Ομάδα Α	-	-	-	-	+	
5	Ομάδα Α	-	-	-	+	-	
6	Ομάδα Α	-	-	-	-	+	
7	Ομάδα Α	-	-	-	-	-	
8	Ομάδα Α	-	-	-	-	-	
9	Ομάδα Α	-	-	-	-	+	
10	Ομάδα Α	-	-	-	-	-	

Ομάδα Α: Κορακοειδή (Κάργια: *Corvus monedula*, Χαβαρόνι: *Corvus frugilegus*,
Καρακάξα: *Pica pica*)



Πίνακας 13

Αποτελέσματα απομόνωσης μικροβίων από δείγματα κοπράνων από άγρια πτηνά του Αμβρακικού Κόλπου.

Α/Α	Δείγμα (προέλευσης)	<i>C. perfringens</i>			Σπόροι	<i>Salmonella sp.</i>
		L. S ζωμός				
		Βλαστικές μορφές				
		10 ⁻¹ αραίωση	10 ⁻² αραίωση	10 ⁻³ αραίωση		
1	Ομάδα Β	-	-	-	-	-
2	Ομάδα Β	-	-	-	+	-
3	Ομάδα Β	-	-	-	-	+
4	Ομάδα Β	-	-	-	-	+
5	Ομάδα Β	-	-	-	+	-
6	Ομάδα Β	-	-	-	-	+
7	Ομάδα Β	-	-	-	-	-
8	Ομάδα Β	-	-	-	-	-
9	Ομάδα Β	-	-	-	-	-
10	Ομάδα Β	-	-	-	-	+

Ομάδα Β: Κονηγόπαπια (*Aythya ferina*)



Πίνακας 14

Αποτελέσματα απομόνωσης μικροβίων από δείγματα κοπράνων από άγρια πτηνά του Αμβρακικού Κόλπου.

Α/Α	Δείγμα (προέλευσης)	<i>C. perfringens</i>				Σπόροι	<i>Salmonella sp.</i>
		L. S ζωμός					
		Βλαστικές μορφές					
		10 ⁻¹ αραίωση	10 ⁻² αραίωση	10 ⁻³ αραίωση			
1	Ομάδα Γ	-	-	-	+	-	
2	Ομάδα Γ	-	-	-	-	+	
3	Ομάδα Γ	-	-	-	-	-	
4	Ομάδα Γ	-	-	-	-	+	
5	Ομάδα Γ	-	-	-	-	+	
6	Ομάδα Γ	-	-	-	+	+	
7	Ομάδα Γ	-	-	-	+	-	
8	Ομάδα Γ	-	-	-	-	+	
9	Ομάδα Γ	-	-	-	-	-	
10	Ομάδα Γ	-	-	-	-	-	

Ομάδα Γ: Τσικνόπαπια (*Aythya fuligula*)



Πίνακας 15

Αποτελέσματα απομόνωσης μικροβίων από δείγματα κοπράνων από άγρια πτηνά που φιλοξενούνται στον Αμβρακικό Κόλπο.

Α/Α	Δείγμα (προέλευσης)	<i>C. perfringens</i>				Σπόροι	<i>Salmonella sp.</i>
		L. S ζωμός					
		Βλαστικές μορφές					
		10 ⁻¹ αραίωση	10 ⁻² αραίωση	10 ⁻³ αραίωση			
1	Ομάδα Δ	-	-	-	+	-	
2	Ομάδα Δ	+	-	-	+	+	
3	Ομάδα Δ	-	-	-	-	-	
4	Ομάδα Δ	-	-	-	-	-	
5	Ομάδα Δ	-	-	-	-	-	
6	Ομάδα Δ	+	-	-	+	-	
7	Ομάδα Δ	-	-	-	-	-	
8	Ομάδα Δ	+	-	-	-	-	
9	Ομάδα Δ	-	-	-	-	-	
10	Ομάδα Δ	+	-	-	-	-	

Ομάδα Δ: Πρασινοκέφαλη (*Anas platyrhynchos*)



Πίνακας 16

Αποτελέσματα απομόνωσης μικροβίων από δείγματα κοπράνων από άγρια πτηνά που φιλοξενούνται στον Αμβρακικό Κόλπο.

Α/Α	Δείγμα (προέλευσης)	<i>C. perfringens</i>				Σπόροι	<i>Salmonella sp.</i>
		L. S ζωμός					
		Βλαστικές μορφές					
		10 ⁻¹ αραίωση	10 ⁻² αραίωση	10 ⁻³ αραίωση			
1	Ομάδα E	-	-	-	+	-	
2	Ομάδα E	+	+	+	+	-	
3	Ομάδα E	-	-	-	-	-	
4	Ομάδα E	-	-	-	-	-	
5	Ομάδα E	-	-	-	-	-	
6	Ομάδα E	+	+	-	-	-	
7	Ομάδα E	-	-	-	-	-	
8	Ομάδα E	-	-	-	-	-	
9	Ομάδα E	+	+	-	-	+	
10	Ομάδα E	-	-	-	-	-	

Ομάδα E: Χουλιάρόπαπια (*Anas clypeata*)



Πίνακας 17

Αποτελέσματα απομόνωσης μικροβίων από δείγματα κοπράνων από άγρια πτηνά που φιλοξενούνται στον Αμβρακικό Κόλπο

Α/Α	Δείγμα (προέλευσης)	<i>C. perfringens</i>			Σπόροι	<i>Salmonella sp.</i>
		L. S ζωμός				
		Βλαστικές μορφές				
		10 ⁻¹ αραίωση	10 ⁻² αραίωση	10 ⁻³ αραίωση		
1	Ομάδα ΣΤ	-	-	-	-	-
2	Ομάδα ΣΤ	+	+	-	-	-
3	Ομάδα ΣΤ	-	-	-	-	-
4	Ομάδα ΣΤ	+	+	-	+	-
5	Ομάδα ΣΤ	-	-	-	-	-
6	Ομάδα ΣΤ	-	-	-		-
7	Ομάδα ΣΤ	+	+	-	-	-
8	Ομάδα ΣΤ	-	-	-	-	-
9	Ομάδα ΣΤ	-	-	-	-	-
10	Ομάδα ΣΤ	+	-	-	+	-

Ομάδα ΣΤ: Κιρκίρι (*Anas crecca*)



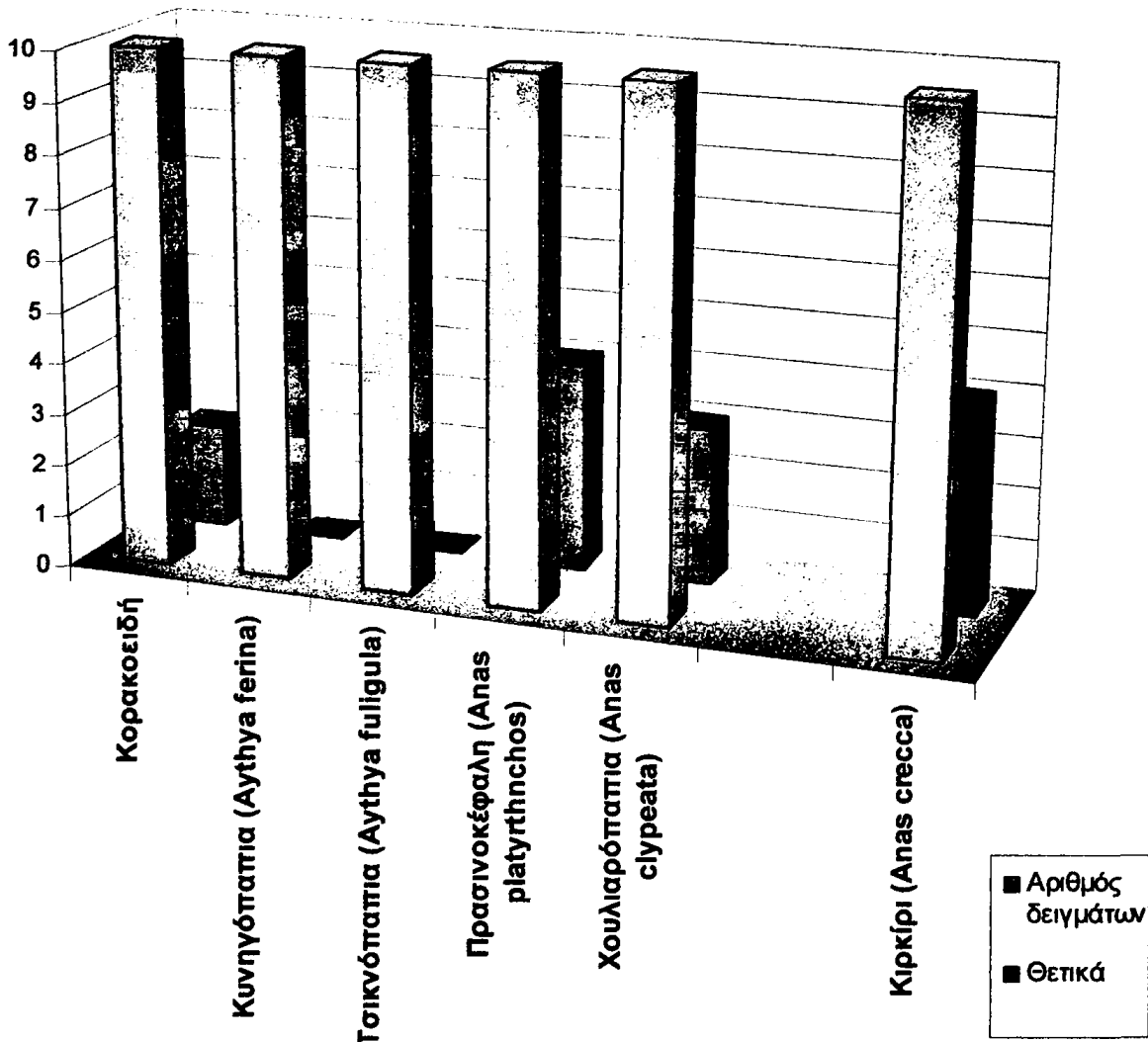
Πίνακας 18

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα απομόνωσης των βλαστικών μορφών του *C. perfringens* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών άγριων πτηνών του Αμβρακικού κόλπου.

Είδη άγριων πτηνών	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά	
		n	%
Κορακοειδή	10	2	20
Κονηγόπαπια (<i>Aythya ferina</i>)	10	0	0
Τσικνόπαπια (<i>Aythya fuligula</i>)	10	0	0
Πρασινοκέφαλη (<i>Anas platyrhynchos</i>)	10	4	40
Χουλιάρόπαπια (<i>Anas clypeata</i>)	10	3	30
Κιρκίρι (<i>Anas crecca</i>)	10	4	40



Σχηματική παράσταση συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων απομόνωσης των βλαστικών μορφών του *C.perfringes* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών άγριων πτηνών του Αμβρακικού Κόλπου



Σχήμα 5.



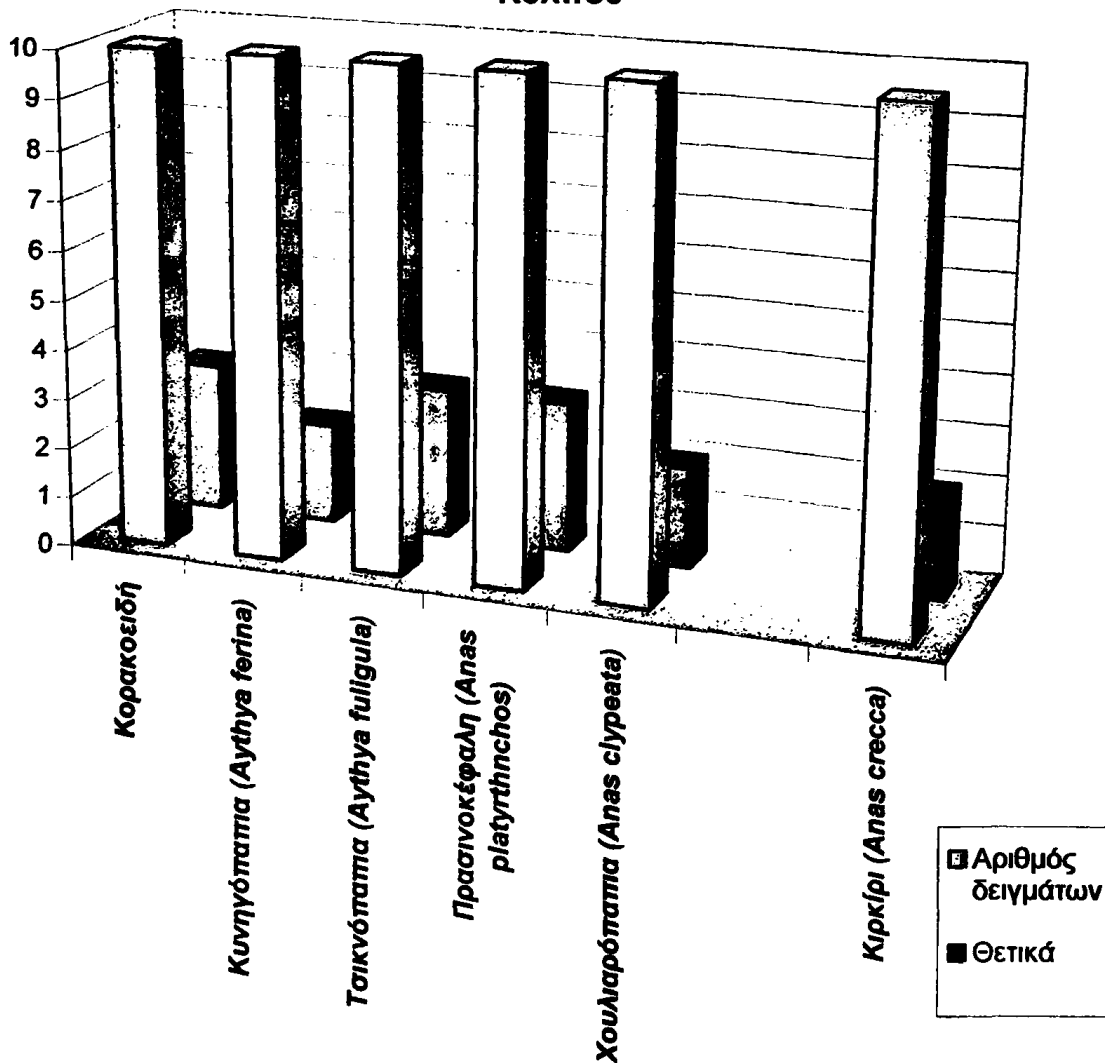
Πίνακας 19.

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα απομόνωσης των σπόρων του *C. perfringens* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών άγριων πτηνών του Αμβρακικού κόλπου.

Είδη άγριων πτηνών	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά	
		n	%
Κορακοειδή	10	3	30
Κυνηγόπαπια (<i>Aythya ferina</i>)	10	2	20
Τσικνόπαπια (<i>Aythya fuligula</i>)	10	3	30
Πρασινοκέφαλη (<i>Anas platyrhynchos</i>)	10	3	30
Χουλιάρόπαπια (<i>Anas clypeata</i>)	10	2	20
Κιρκίρι (<i>Anas crecca</i>)	10	2	20



Σχηματική παράσταση συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων απομόνωσης των σπόρων του *Clostridium perfringens* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών άγριων πτηνών του Αμβρακικού Κόλπου



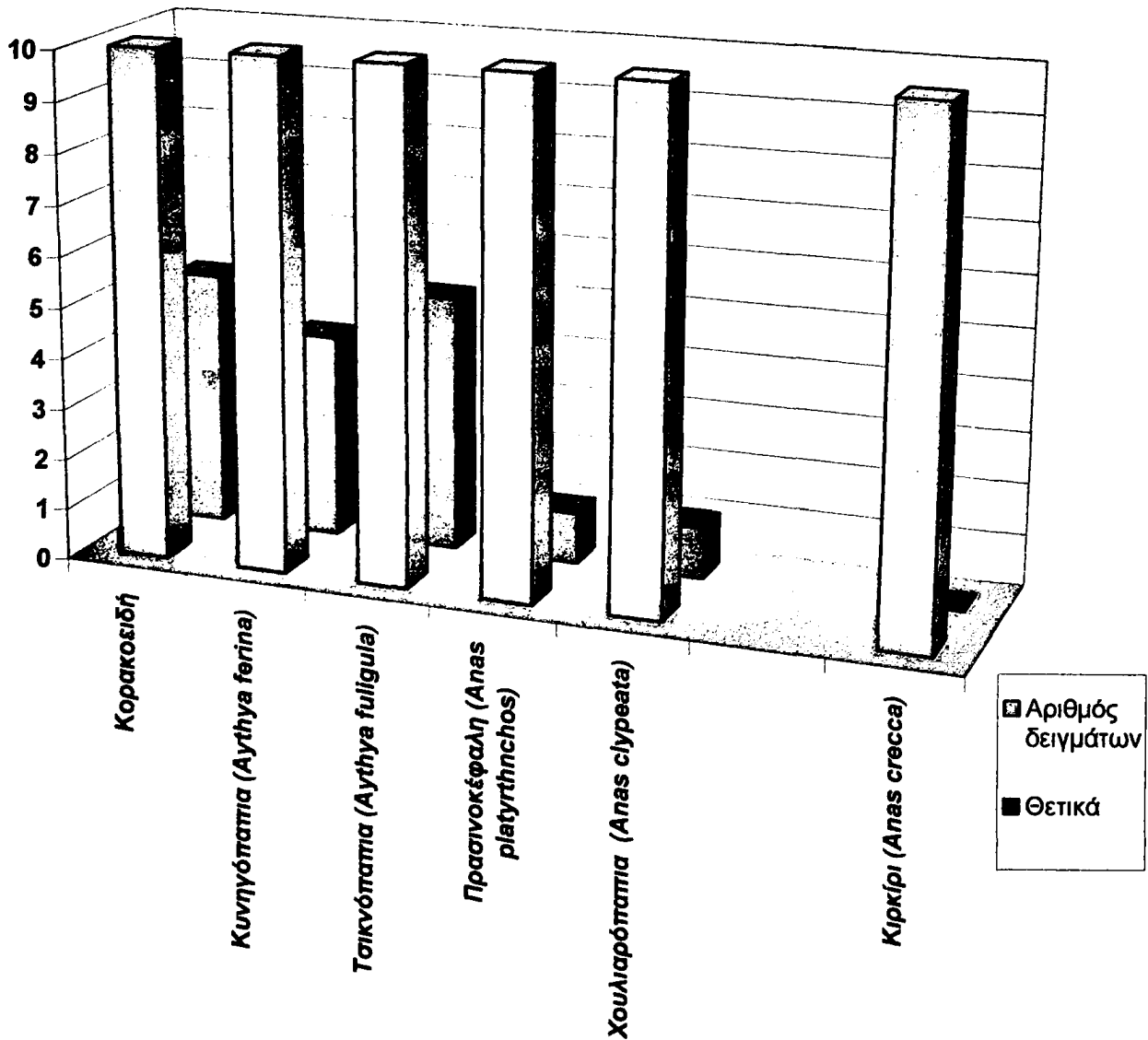
Σχήμα 6.

Πίνακας 20.
 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα απομόνωσης του *Salmonella spp* από δείγματα κοπράνων
 έξι άγριων πτηνών του Αμβρακικού κόλπου.

Είδη άγριων πτηνών	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά	
		n	%
Κορακοειδή	10	5	50
Κυνηγόπαπια (<i>Aythya ferina</i>)	10	4	40
Τσικνόπαπια (<i>Aythya fuligula</i>)	10	5	50
Πρασινοκέφαλη (<i>Anas platyrhynchos</i>)	10	1	10
Χουλιάρόπαπια (<i>Anas clypeata</i>)	10	1	10
Κιρκίρι (<i>Anas crecca</i>)	10	0	0



Σχηματική παράσταση συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων απομόνωσης του *Salmonella* spp. από δείγματα κοπράνων έξι ειδών άγριων πτηνών του Αμβρακικού Κόλπου



Σχήμα 7.



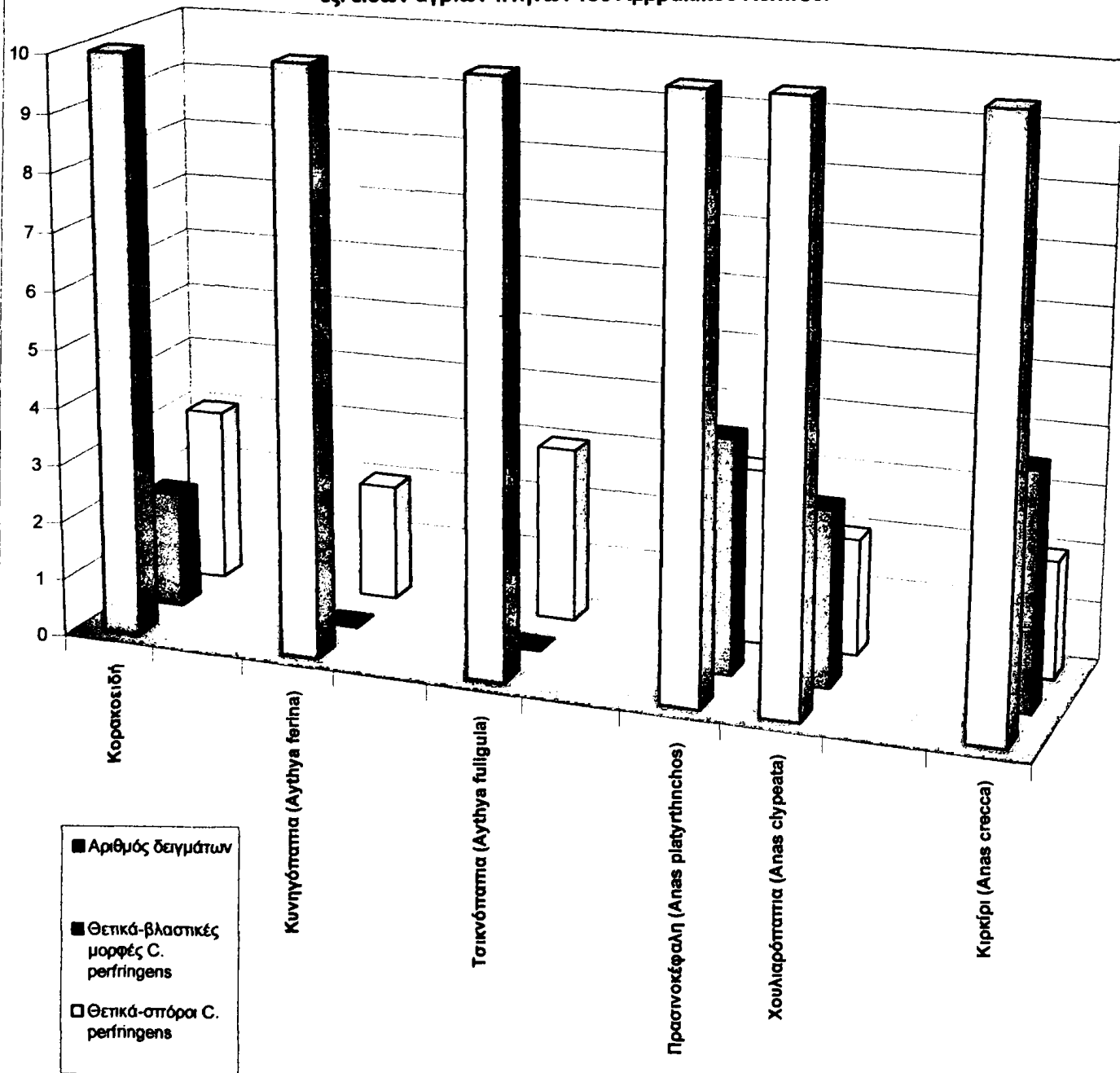
Πίνακας 21.

Σύγκριση των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων απομόνωσης των βλαστικών μορφών και των σπόρων του *C. perfringens* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών άγριων πτηνών του Αμβρακικού Κόλπου.

Είδη άγριων πτηνών	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά-βλαστικές μορφές <i>C. perfringens</i>		Θετικά-σπόροι <i>C. perfringens</i>	
		n	%	n	%
Κορακοειδή	10	2	20	3	30
Κυνηγόπαπια (<i>Aythya ferina</i>)	10	0	0	2	20
Τσικνόπαπια (<i>Aythya fuligula</i>)	10	0	0	3	30
Πρασινοκέφαλη (<i>Anas platyrhynchos</i>)	10	4	40	3	30
Χουλαρόπαπια (<i>Anas clypeata</i>)	10	3	30	2	20
Κικίρι (<i>Anas crecca</i>)	10	4	40	2	20



Σχηματική παράσταση των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων απομόνωσης των βλαστικών μορφών και των σπόρων *Clostridium perfringens* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών άγριων πτηνών του Αμβρακικού Κόλπου.



Σχήμα 8.



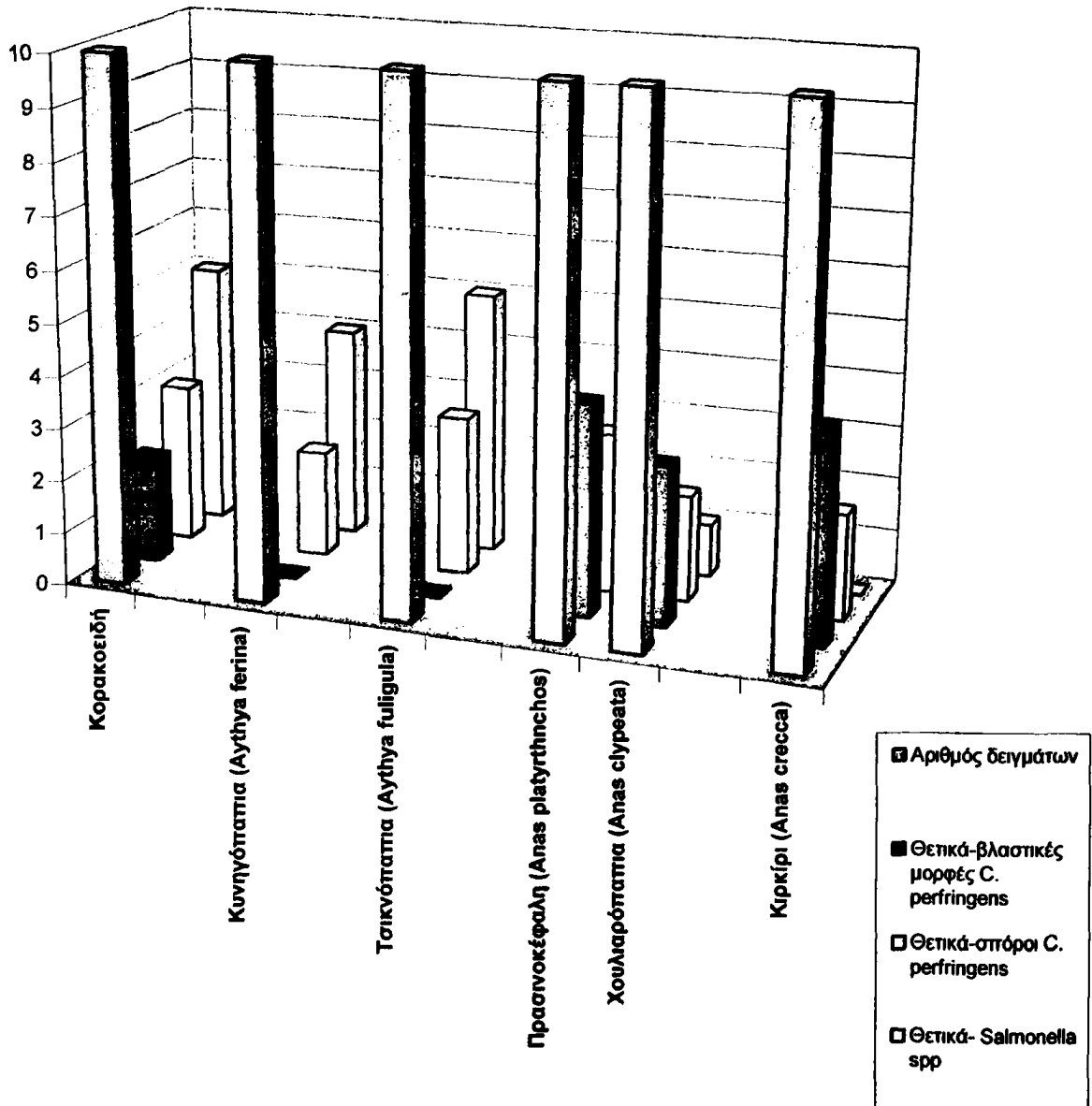
Πίνακας 22.

Σύγκριση των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων απομόνωσης των βλαστικών μορφών και των σπόρων του *C. perfringens* και της απομόνωσης του *Salmonella spp* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών υδρόβιων πτηνών του Αμβρακικού κόλπου.

Είδη άγριων πτηνών	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά-βλαστικές μορφές <i>C. perfringens</i>		Θετικά-σπόροι <i>C. perfringens</i>		Θετικά- <i>Salmonella spp</i>	
		n	%	n	%	n	%
Κορακοειδή	10	2	20	3	30	5	50
Κυνηγόπαπια (<i>Aythya ferina</i>)	10	0	0	2	20	4	40
Τσικνόπαπια (<i>Aythya fuligula</i>)	10	0	0	3	30	5	50
Πρασινοκέφαλη (<i>Anas platyrhynchos</i>)	10	4	40	3	30	1	10
Χουλιάρόπαπια (<i>Anas cyreata</i>)	10	3	30	2	20	1	10
Κιρκίρι (<i>Anas crecca</i>)	10	4	40	2	20	0	0



Σχηματική παράσταση σύγκρισης συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων απομόνωσης των βλαστικών μορφών και των σπόρων του *Clostridium perfringens* και απομόνωσης του *Salmonella spp* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών άγριων πτηνών στον Αμβρακικό Κόλπο.



Σχήμα 9.

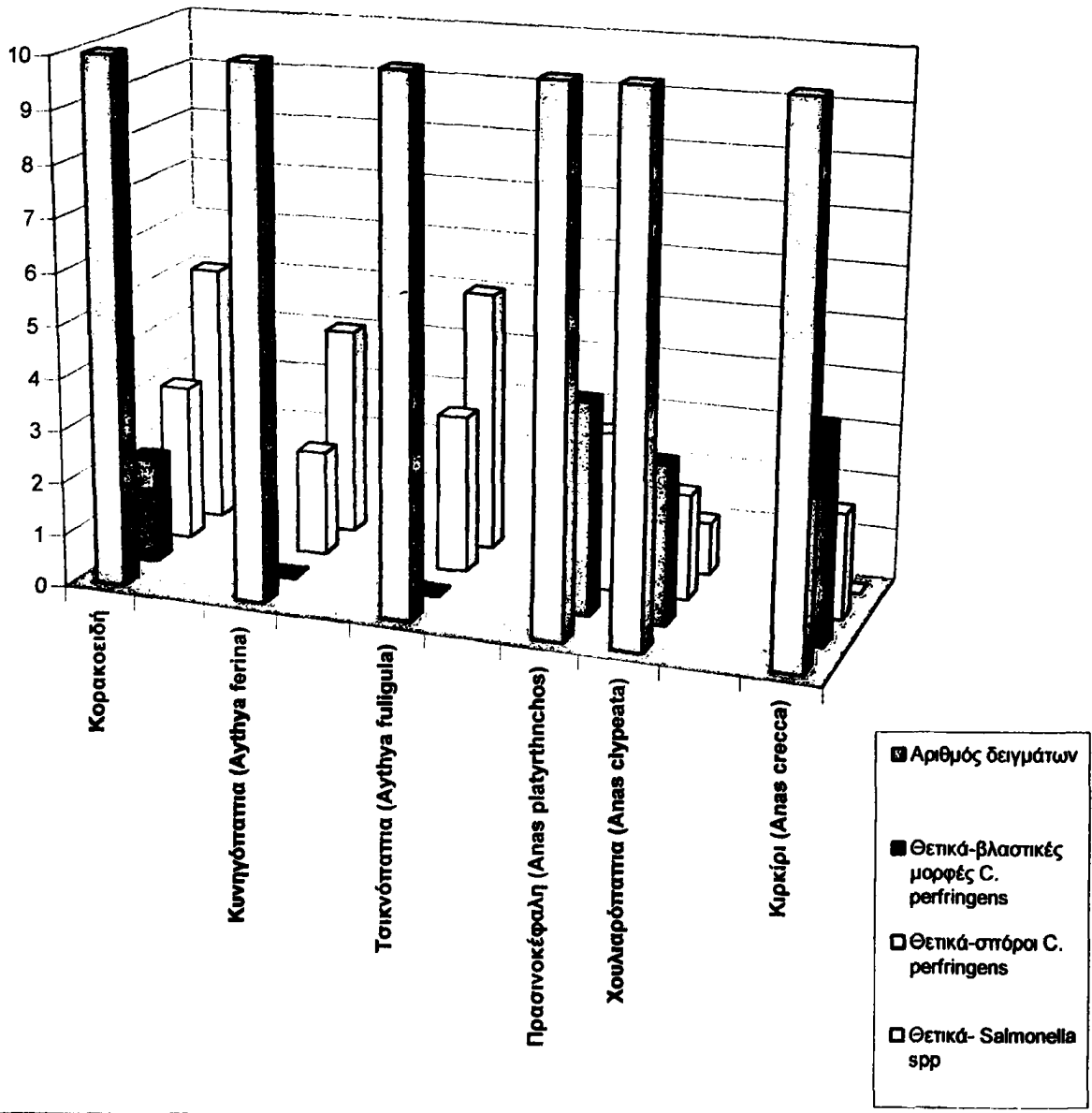
Πίνακας 22.

Σύγκριση των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων απομόνωσης των βλαστικών μορφών και των σπόρων του *C. perfringens* και της απομόνωσης του *Salmonella spp* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών υδροβίων πτηνών του Αμβρακικού κόλπου.

Είδη άγριων πτηνών	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά-βλαστικές μορφές <i>C. perfringens</i>		Θετικά-σπόροι <i>C. perfringens</i>		Θετικά- <i>Salmonella spp</i>	
		n	%	n	%	n	%
Κορακοειδή	10	2	20	3	30	5	50
Κουνηγόπαπια (<i>Aythya ferina</i>)	10	0	0	2	20	4	40
Τσικνόπαπια (<i>Aythya fuligula</i>)	10	0	0	3	30	5	50
Πρασινοκέφαλη (<i>Anas platyrhynchos</i>)	10	4	40	3	30	1	10
Χουλιάρόπαπια (<i>Anas cyreata</i>)	10	3	30	2	20	1	10
Κιρκίρι (<i>Anas crecca</i>)	10	4	40	2	20	0	0



Σχηματική παράσταση σύγκρισης συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων απομόνωσης των βλαστικών μορφών και των σπόρων του *Clostridium perfringens* και απομόνωσης του *Salmonella spp* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών άγριων πτηνών στον Αμβρακικό Κόλπο.



Σχήμα 9.

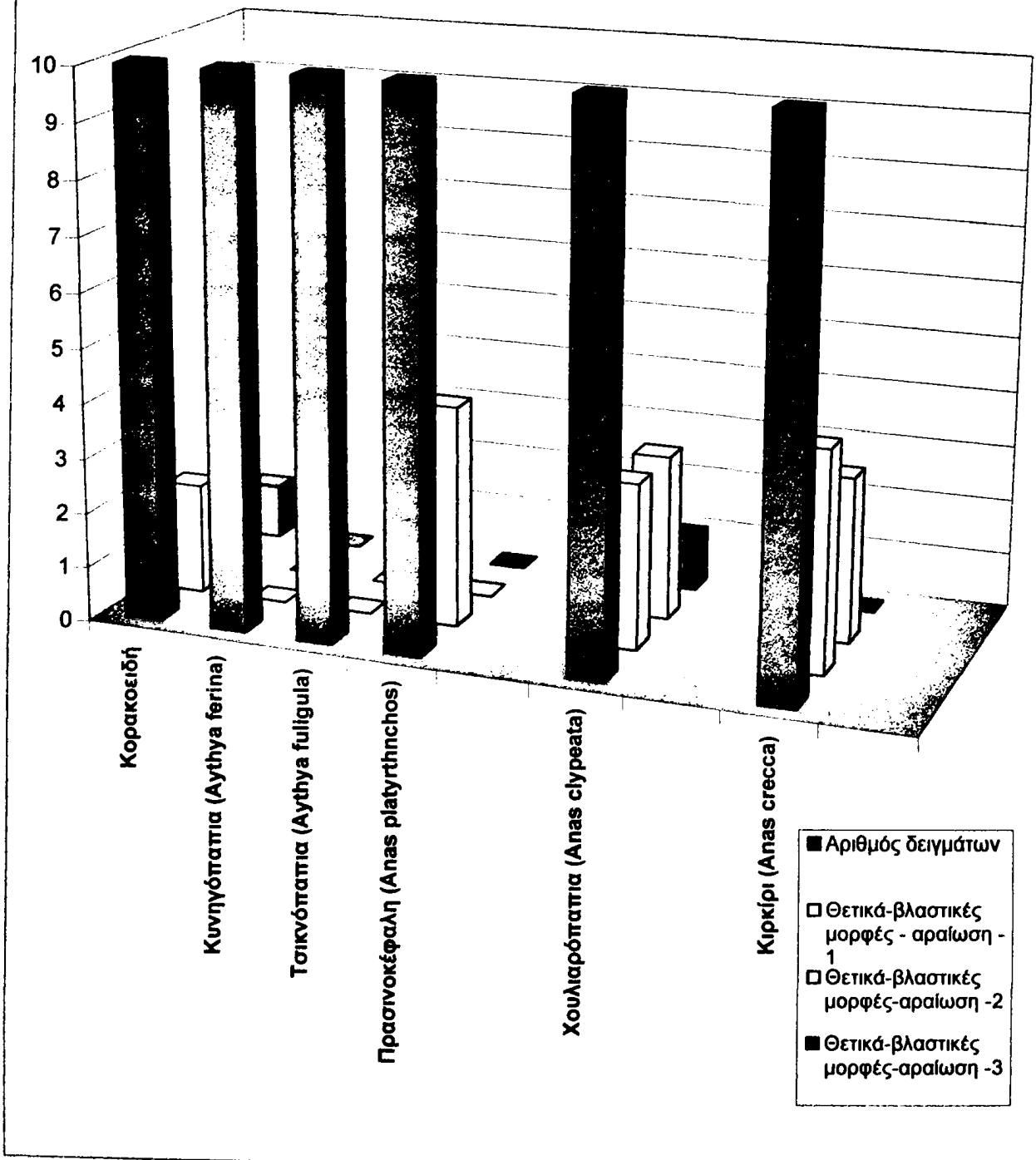
Πίνακας 23.

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα αραιώσεων του L.S. broth της απομόνωσης των βλαστικών μορφών του *C. perfringens* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών υδρόβιων πτηνών του Αμβρακικού κόλπου.

Είδη άγριων πτηνών	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά-βλαστικές μορφές <i>C. perfringens</i>		
		10 ⁻¹ αραιώση	10 ⁻² αραιώση	10 ⁻³ αραιώση
Κορακοειδή	10	2	1	1
Κονηγόπαπια (<i>Aythya ferina</i>)	10	0	0	0
Τσικνόπαπια (<i>Aythya fuligula</i>)	10	0	0	0
Πρασινοκέφαλη (<i>Anas platyrhynchos</i>)	10	4	0	0
Χουλιάρόπαπια (<i>Anas clypeata</i>)	10	3	3	1
Κιρκίρι (<i>Anas crecca</i>)	10	4	3	0



Σχηματική παράσταση των αποτελεσμάτων των αραιώσεων του L.S. Broth της απομόνωσης των βλαστικών μορφών του *C.pfeifferingens* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών άγριων πτηνών του Αμβρακικού Κόλπου



Σχήμα 10.

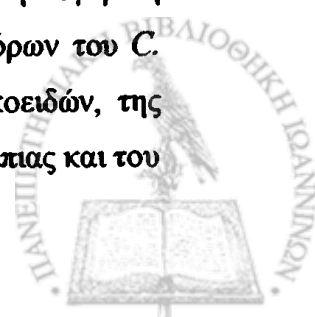
Στους πίνακες 12-17 έχουν καταγραφεί τα αποτελέσματα από την απομόνωση των παθογόνων μικροβίων *Salmonella spp* και *C. perfringens* από δείγματα κοπράνων έξι ειδών άγριων πτηνών, τόσο αποδημητικών όσο και επιδημητικών, τα οποία είναι τα Κορακοειδή (Κάργια: *Corvus monedula*, Χαβαρόνι: *Corvus frugilegus*, Καρακάξα: *Pica pica*), η Κυνηγόπαπια (*Aythya ferina*), η Τσικνόπαπια (*Aythya fuligula*), η Πρασινοκέφαλη (*Anas platyrhynchos*), η Χουλιάροπαπια (*Anas clypeata*) και το Κιρκίρι (*Anas crecca*).

Από τα εξήντα (60) δείγματα των άγριων πτηνών τα δεκαέξι (16) ήταν θετικά για το παθογόνο μικρόβιο *Salmonella* (ποσοστό περίπου 27%), ενώ δεκατρία (13) από τα εξήντα (60) δείγματα βρέθηκαν θετικά για τις βλαστικές μορφές του παθογόνου μικροβίου *C. perfringens* (ποσοστό περίπου 22%) και δεκαπέντε (15) από τα εξήντα (60) θετικά για τους σπόρους (ποσοστό 25%).

Στον πίνακα 18 και στο σχήμα 5 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της απομόνωσης των βλαστικών μορφών του *C. perfringens* από τα εξήντα (60) δείγματα κοπράνων των έξι ειδών άγριων πτηνών (10 δείγματα για καθένα από τα έξι αυτά είδη άγριων πτηνών). Παρατηρείται ότι θετικά δείγματα για το παθογόνο μικρόβιο βρέθηκαν στα δέκα (10) δείγματα αντίστοιχα των Κορακοειδών σε ποσοστό 20%, της Πρασινοκέφαλης σε ποσοστό 40%, της Χουλιάροπαπιας σε ποσοστό 30% και στο Κιρκίρι σε ποσοστό 40%. Ενώ δεν βρέθηκαν θετικά δείγματα στα είδη της Κυνηγόπαπιας και της Τσικνόπαπιας.

Στον πίνακα 19 και στο σχήμα 6 έχουν καταγραφεί και απεικονιστεί τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της απομόνωσης των σπόρων του *C. perfringens* από τα εξήντα (60) δείγματα κοπράνων των έξι ειδών των άγριων πτηνών (10 δείγματα για το καθένα από τα είδη αυτά). Τα θετικά για το παθογόνο μικρόβιο στα δέκα (10) δείγματα των Κορακοειδών ήταν τρία (3) (ποσοστό 30%), στα δέκα (10) δείγματα της Κυνηγόπαπιας τα θετικά ήταν (2) (ποσοστό 20%), στα δέκα (10) δείγματα της Τσικνόπαπιας τα θετικά ήταν τρία (3) (ποσοστό 30%), στα δέκα (10) δείγματα της Πρασινοκέφαλης τα θετικά ήταν τρία (3) (ποσοστό 30%), στα δέκα (10) δείγματα της Χουλιάροπαπιας τα θετικά ήταν δύο (2) (ποσοστό 20%) και στα δέκα (10) δείγματα του Κιρκιριού τα θετικά ήταν (2) (ποσοστό 20%).

Στην σχηματική παράσταση 8 και στον πίνακα 21 αποτυπώνεται η σύγκριση των αποτελεσμάτων απομόνωσης των βλαστικών μορφών και των σπόρων του *C. perfringens* από δέκα (10) δείγματα κοπράνων αντίστοιχα των Κορακοειδών, της Κυνηγόπαπιας, της Τσικνόπαπιας, της Πρασινοκέφαλης, της Χουλιάροπαπιας και του



Κιρκιριού. Δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν από στην ευρύτερη περιοχή του Αμβρακικού Κόλπου και που αναλύθηκαν παραπάνω.

Ακολούθως στον πίνακα 20 και στο σχήμα 7 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της απομόνωσης του *Salmonella spp* από τα εξήντα (60) δείγματα κοπράνων των έξι ειδών άγριων πτηνών (10 δείγματα για το καθένα από τα είδη αυτά). Από τα δείγματα των Κορακοειδών πέντε (5) βρέθηκαν θετικά για το παθογόνο μικρόβιο, στην Κυνηγόπαπια τέσσερα (4), στην Τσικνόπαπια πέντε (5), στην Πρασινοκέφαλη ένα (1) και στην Χουλιάρόπαπια ένα (1). Ενώ δεν βρέθηκαν θετικά δείγματα στο Κιρκίρι. Παρατηρείται ότι σχεδόν το 27% των εξήντα (60) συνολικά δειγμάτων είναι θετικό για το *Salmonella spp*.

Στη συνέχεια συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα απομόνωσης των βλαστικών μορφών και των σπόρων του *C. perfringens* και της απομόνωσης του *Salmonella spp* από τα εξήντα (60) δείγματα των άγριων πτηνών του Αμβρακικού Κόλπου (πίνακας 22, σχήμα 9). Από το ιστόγραμμα φαίνεται ότι στα πτηνά αυτά βρέθηκαν σε ποσοστό 27% δείγματα θετικά για το βακτήριο *Salmonella spp*, ενώ το ποσοστό των θετικών δειγμάτων για τις βλαστικές μορφές του παθογόνου μικροβίου *C. perfringens* βρέθηκε 22% και για τους σπόρους του το 25%.

Στον πίνακα 23 και στο αντίστοιχο ιστόγραμμά του 10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αραιώσεων του L.S. Broth της απομόνωσης των βλαστικών μορφών του *C. perfringens* από τα δείγματα κοπράνων των έξι ειδών άγριων πτηνών του Αμβρακικού κόλπου.

Εμφανίζονται δύο (2) θετικά δείγματα για το παθογόνο βακτήριο *C. perfringens* των Κορακοειδών στην αραιώση 10^{-1} και ένα (1) θετικό στην αραιώση 10^{-2} και ένα (1) θετικό στην αραιώση 10^{-3} . Από κανένα θετικό δείγμα για το παθογόνο βακτήριο στην αραιώση 10^{-1} της Κυνηγόπαπιας και Τσικνόπαπιας, δεν εμφανίζονται θετικά στην αραιώση 10^{-2} και στην αραιώση 10^{-3} αντίστοιχα. Ακολούθως από κανένα θετικό δείγμα για το παθογόνο βακτήριο στην αραιώση 10^{-2} και 10^{-3} της Πρασινοκέφαλης, αλλά εμφανίζει τέσσερα (4) θετικά δείγματα στην αραιώση 10^{-1} . Από τρία (3) θετικά δείγματα για το παθογόνο βακτήριο στην αραιώση 10^{-2} και 10^{-3} της Χουλιάρόπαπιας και ένα θετικό δείγμα στην αραιώση 10^{-1} . Επίσης, για το Κιρκίρι εμφανίζονται τέσσερα (4) θετικά δείγματα στην αραιώση 10^{-1} , τρία (3) θετικά δείγματα στην αραιώση 10^{-2} και κανένα θετικό δείγμα στην αραιώση 10^{-3} .



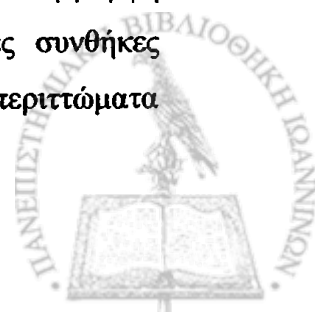
V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, που ήταν και η πρώτη συστηματική έρευνα που πραγματοποιήθηκε στον υδροβιότοπο του Αμβρακικού κόλπου για τη βιοποικιλότητα παθογόνων ειδών μικροβίων στον υδροβιότοπο, δείχνουν ότι τα παθογόνα μικρόβια *Salmonella spp* και *C. perfringens* υπάρχουν σε σημαντικά ποσοστά στα άγρια υδροβία πτηνά που φιλοξενούνται στην περιοχή.

Οι μολύνσεις από *Salmonella* στους πληθυσμούς των άγριων πτηνών είναι παγκοσμίως διαδεδομένες (Tizard, 2004), γεγονός που συμφωνεί με την παρούσα έρευνα από την οποία βρέθηκε ότι από τα εξήντα (60) δείγματα των άγριων πτηνών τα δεκαέξι (16) ήταν μολυσμένα από το συγκεκριμένο παθογόνο μικρόβιο (ποσοστό περίπου 27%).

Σε παρόμοιες μελέτες πληθυσμών άγριων πτηνών στην Ευρώπη, αλλά και την Αμερική διαπιστώθηκε ότι τα μεταναστευτικά πτηνά *Larus cacchianans* (ασημόγλαροι) και *Larus ridibundus* (καστανοκεφαλόγλαροι), μπορούν να αποτελούν τους κύριους ξενιστές για την μεταφορά του βακτηρίου *Salmonella* και σε άλλα πτηνά. Αντίστοιχα από την παρούσα έρευνα μπορεί να διαπιστωθεί ότι τα έξι είδη άγριων πτηνών *Aythya ferina* (Κυνηγόπαπια), *Aythya fuligula* (Τσικνόπαπια), *Anas platyrhynchos* (Πρασινοκέφαλη), *Anas chrypeata* (Χουλιάρόπαπια), *Anas crecca* (Κιρκίρι) και τα Κορακοειδή είναι οι κύριοι ξενιστές για τις *Salmonella* στα πτηνά της περιοχής του Αμβρακικού κόλπου, καθώς και άλλων περιοχών (όλα τα άγρια πτηνά που μελετηθήκαν είναι και αποδημητικά και επιδημητικά πτηνά).

Στα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος βρέθηκε σε σημαντικό ποσοστό το βακτήριο *C. perfringens* στις βλαστικές του μορφές (ιδιαίτερα στα 60 δείγματα από τα άγρια πτηνά σε ποσοστό περίπου 22%), όπως και με τη σπορογόνο του μορφή που βρέθηκε στα εξήντα (60) συνολικά δείγματα των πτηνών σε ποσοστό 25%. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη φύση του βακτηρίου το οποίο συναντάται στο έδαφος μόνο στη σπορογόνο του μορφή, καθότι είναι αναερόβιο. Τα άγρια ζώα της περιοχής διατρεφόμενα από το έδαφος λαμβάνουν το βακτήριο στη σπορογόνο του μορφή (δεν το έχουν σαν φυσιολογικό ένικο στο γαστρεντερικό τους σωλήνα στη σπορογόνο μορφή, αλλά στις βλαστικές του μορφές) και το διατηρούν στη μορφή αυτή. Τα χρόνια νοσήματα και η διαχείριση των ζώων σε έντονες συνθήκες επηρεάζουν το βαθμό αποβολής του μικροβίου *C. perfringens* με τα περιττώματα τους (Genigeorgis, 1975).



Ανακεφαλαιώνοντας τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι τα παθογόνα μικρόβια *Salmonella spp* και *C. perfringens* υπάρχουν σε μεγάλα ποσοστά στα άγρια πτηνά που φιλοξενούνται στην περιοχή του Αμβρακικού κόλπου και θεωρείται σκόπιμο να ληφθούν σοβαρά μέτρα για τη σωστή διαχείριση της περιοχής, ώστε να μειωθούν σημαντικά τα ποσοστά των δύο αυτών βακτηρίων. Τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα αυτής της μελέτης ίσως να αποτελούν μια καλή βάση για περαιτέρω έρευνα για ταυτοποίηση των στελεχών των μικροβίων και μελέτη τους και σε εδάφη ή νερά της περιοχής, καθότι αμφότερα τα παθογόνα αυτά είδη μπορούν εύκολα να διασπαρούν και να προκαλέσουν οργανικές βλάβες σε κατοικίδιους πληθυσμούς ζώων, όπως και στον άνθρωπο.



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 characterization of *C.perfringens* delta - toxin. Infect. Immun. 31, 536 – 546.
- Arvanitidou, M., A. Papa, T. C. Constantinidis, V. Danielides, and V. Katsouyannopoulos. (1997). The occurrence 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.
- 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. and Delcoute 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..
- Bidwell E. (1950) Proteolytic enzymes of *C.welchii*.Biochem. J. 46, 589-598.
- Βόϊδαρου Χρύσα (2002). Προσδιορισμός κλωστηριδίων από διάφορους οικοτόπους σε περιπτώσεις εντερολοιμώξεων και διαταραχών της εντερικής χλωρίδα, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, σελ. 1 – 176.



- 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) Futher 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.
- Δημητρακόπουλος Ο. Γεώργιος, Μικροβιολογία ΙΙ, Πανεπιστήμιο Πατρών, Αθήνα, 1994, σελ. 60 - 66.
- Doyle M., Beuchat 1., 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.
- Gkiourtzidis L., Frey J., Bourtzi-Hatzipoulou E., Iliadis N., and Sarris K. (2001) PCR detection and prevalence of α -, β -, β_2 -, ϵ -, ι - 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.



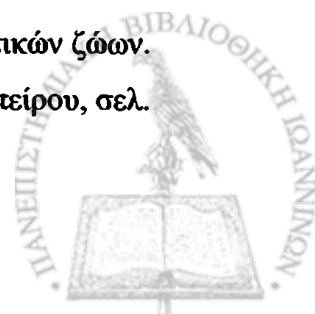
- Hall W.M., Witzerman J.S. and James R. (1969). The detection and enumeration of *C. perfringens* in foods. *J. Food Sci.* 34, 212-214.
- Hatheway C. L. (1990). Toxigenic *Clostridia*. *Clin. Microbiol.Rev.*3, 66.
- Hauschild A., Walcraft M. and Campbell W. (1971). Emesis and diarrhea induced by enterotoxin of *C. perfringens* type A in monkeys. *Can. J. Microbiol.*17, 1141-1143.
- Headington J.J., Sathornsumathi S., Simarks S., Sujatanon D.W. (1966). Segmental infarcts of the small intestine and mesenteric adenitis in Thai children *Lancet* 1, 802.
- Hobbs B. and Sutton R. (1969). Characteristics of spores of *Clostridium welchii* in relation to food hygiene. *In the anaerobic bacteria*, 3, 31-39. Canada.
- Holt J. G. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9nd ed. Williams & Wilkins (Baltimore), 310-328 & 551-563.
- Holt J. G. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 4nd ed. Williams & Wilkins (Baltimore), 253-268 & 341-353.
- Ispolatovskaya M. V. (1972). Type A *C.perfringens* toxin. *In Kadis S., Montie T. C., and Ajk S. J. (eds), Microbiol Toxins.* 14, 109-158. London.
- Kaufmann, A. F. (1966). Pets and *Salmonella* infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 149, 1655–1661.
- Κέγκος Ν. Θεοχάρης (2003), Διερεύνηση παραγόντων που ευνοούν την ανάπτυξη *Clostridium spp* ανάλογα με την πηγή προέλευσης, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, σελ 31-131, Ιωάννινα.
- Kruse N. (1896) *In the micro-organisms.* 3rd ed, Ed. Flugge Leipzig (German). 2, 242.
- Labbe R.G., Juneja V.K. (2001). *Clostridium perfringens*. *In: H. Riemann & F.L. Bryan. Foodborne infections and intoxications.* NY: Academic Press. (in press) .
- Ledger W. and Hackett K. (1973) Significance of *Clostridia* in the female reproductive tract. *Obstet. Gynecol.* 41, 525.
- Mansson L. and Collda hl. H. (1963). The intestinal flora in patients with bronchial asthma and Rheumatoid arthritis. *Acta Allergo* 8, 94.



- Martins H., Martins M., Dias M., Bernardo F. (2001). Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. *J Food Microbiol.* 24, 196-197.
- McClane B.A. (1997). *Clostridium perfringens*. In Doyle M.P., Beuchat L. and Montville T.T. (eds). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* 17, 305-326.
- Miwa T. (1975). *Clostridia* in soil of the Antarctica. *Japan J Med Sci Biol.* 24, 605-607.
- Miyata S., Kozula S., Yasuda Y., Chen Y., Moriyama R., Tochikyo K. and Makimos (1997). Localization of germination specific spore-lytic enzymes in *C.perfringens* S40 spores detected by immunoelectron micros copy. *FEMS Microbiology. Let.* 152, 243-47.
- Narayan K. (1966). Studies on Clostridial incidence in beef cattle. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 16, 65-72.
- Nichida S., Seo W. and Nakagama M. (1969). Sporulation, heat resistance and biological properties of *C. perfringens*. *Appl. Microbiol.* 13, 303-309.
- Panagiou A., Savvidis I., Theodorou D. and Berzitzoglou E. (1998) Influence of light on the presence of *C. perfringens* in caves. *Clin. Inf. Dis.* 20, 5380-5381.
- Pasteur L. and Joubert J. (1877). Anthax and septicaemia. *Bull. Acad. Med. Paris.* 6, 781.
- Pergantis F. (2001). The birds of Amvrakikos. *Greek Company of Protection of Nature, (Athens)*, 3-13
- Rhodehamel J., Harmon S. M. (1998). *Clostridium perfringens*. In R. W. Bennett.FDA. *Bacteriological Manual.* 8th edition.38, 1601-1606.
- Roberts T.A. (1969). Heat and radiation resistance and activation of spores of *C. perfringens* *J. Appl. B. Act.* 31, 133-144.
- Sakurai J. (1995). Toxins of *C. perfringens* *Rev. Med. Microbiol.* 6, 175-185.
- Sakurai J. and Kobayashi. (1995). Lethal and dermonecrotic activities of *C.perfringens* iota toxin: biological activities induced by cooperation of two nonlinked components. *Microbiol. Immun.* 39, 249-253.
- Σαλέπη Μ., (2005). Απομόνωση και διερεύνηση παθογόνων μικροβίων *Salmonella spp* και *C. perfringens* στο οικοσύστημα του αμβρακικού κόλπου (λιμνοθάλασσα Ροδιάς), σελ 4-121.



- Σκούφος Ι., (2002). Λοιμώδη νοσήματα και υγιεινή των ζώων, (τόμος Α). Σχολή Τεχνολόγων Γεωπονίας, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, ΤΕΙ Ηπείρου, σελ 1-210.
- Σκούφος Ι., (2002). Λοιμώδη νοσήματα και υγιεινή των ζώων, (τόμος Β). Σχολή Τεχνολόγων 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 L. and Holdeman L. (1965). The pathogenic anaerobic bacteria. 1968. Spores 3, Washington DC. 1, 1-24.
- 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 Microbial.* 7, 265.
- Tizard Ian (2004). *Salmonellosis in Wild Birds*. 50-66.
- Τζώρα Αθηνά., (2002). Μικροβιολογία και Ανοσολογία των αγροτικών ζώων. Σχολή Τεχνολόγων Γεωπονίας, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, ΤΕΙ Ηπείρου, σελ. 1-172



- 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.
- 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* 8th ed. 3, 308.
- Willis A. (1969) *Clostridia of wound infection.* Butterworth and Co. London. 22, 705-708.
- 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.

Πηγές ηλεκτρονικού δικτύου:

- <http://www.geocities.com>, 2006.
- <http://www.homepages.uel.ac.uk>, 2006.
- http://www.umu.se/cm/6_Avhandlingar/Palmgren_abstract.htm, 2006.
- <http://www.eppkas.gr/poulia.htm>, 2006
- <http://www.en.wikipedia.org>, 2006.
- <http://www.greeklanascapes.com>, 2006.
- <http://www.emvelia.gr>, 2006.
- <http://00357.com/com/index2/kinigi/default.asp>, 2006
- <http://67.18.47.148/com/index2/kinigi/text/thiramata.asp>, 2006

