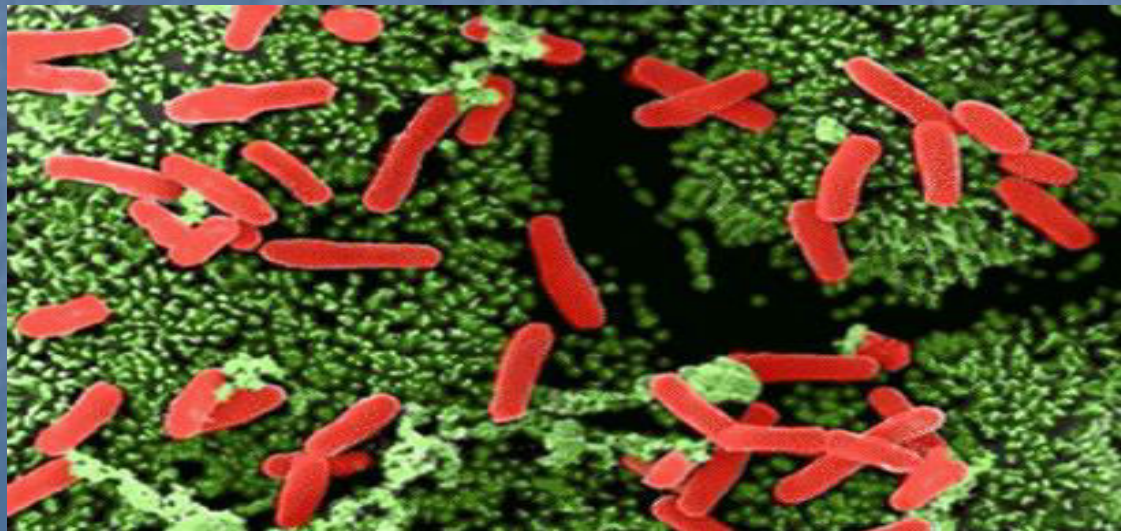


ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΩΝ



**Το γένος των Clostridium που ανήκει στην
οικογένεια Bacilaceae κατά Bergey περιλαμβάνει
ραβδιόμορφα σπορογόνα βακτήρια**

Απαντώνται στο περιβάλλον με δύο μορφές:

- **τις βλαστικές μορφές**
- **τους σπόρους.**

Η ταυτοποίηση των κυριότερων παθογόνων Clostridium, γίνεται βάσει των βιοχημικών ιδιοτήτων λαμβάνοντας

υπόψιν και τα ακόλουθα

- μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας
- μακροσκοπική παρατήρηση των αποικιών
- έλεγχο της κινητικότητας
- αδρανοποίηση των τοξινών
- σχηματισμό λιπαρών οξέων
- έλεγχο της παθογόνου δράσης

Αν και τα είδη των κλωστηριδίων βρίσκονται παντού στη φύση, οι κύριες δεξαμενές τους είναι το έδαφος και ο πεπτικός σωλήνας αρκετών ζώων και του ανθρώπου

Τα είδη που συχνότερα απομονώνονται από το έδαφος είναι τα *C.subterminale*, *C.sordellii*, *C.sporogenes*, *C.indolis*, *C.bifermetans*, *C.mangenotii*, *C.perfringens*

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση του Clostridium είναι :

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

Αντιβιογράμμα

Το αντιβιογράμμα περιλαμβάνει δίσκους κολιστίνης (10 mg), πενικιλίνης (2 U) και βανκομυκίνης (5 μgr).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.
Αντιβιοτικά**

C.perfringens (και είδη Clostridium που παράγουν τοξίνη – α)	Κολιστινη	Πενικιλίνη	Βανκομυκίνη
	Α	ΕΑ	Δ

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

Πίνακας 4
ΕΙΔΗ CLOSTRIDIUM

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ	<i>C.perfringens</i>	<i>C.barati</i>	<i>C.bifermentans</i>	<i>C.sordellii</i>
Κινητικότητα	-		+	+
Ζύμωση λακτόζης	+		-	-
Ρευστοποίηση ζελατίνης	+		+	+
Παραγωγή ουρεασης	- +		-	+

Νέες μέθοδοι ταυτοποίησης των Clostridium κυρίως του C.perfringens.

- Υβριδισμός νουκλεϊνικών οξέων (PCR)
- Αντιγόνα.
- Τεχνικές της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο

Συστήματα επώασης αναερόβιων καλλιεργείων

- Χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό
- Μικρή συγκέντρωση οξυγόνου.

Συστήματα επώασης αναερόβιων καλλιεργείων.

1. Αναερόβια φιάλη
2. Αναερόβιο σύστημα μιας χρήσης
3. Αναερόβιος θάλαμος
4. Αναερόβιος περιστρεφόμενος σωλήνας

Αναερόβιο σύστημα μιας χρήσης



Αναερόβιος θάλαμος



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

- το νέο θρεπτικό υλικό, το Lactose – Sulfite Medium (L.S broth , το οποίο είναι υπερεκλεκτικό για την απομόνωση του C.perfringens, δίνοντας νέα ώθηση στις επιδημιολογικές μελέτες και στην ευχερέστερη ταυτοποίηση του.
- Ο L.S broth δίνει τη δυνατότητα να προσδιορίζεται έστω και ελάχιστος αριθμός βλαστικών ή σπορογόνων μορφών του C. perfringens στα εξεταζόμενα δείγματα.

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

- **Θόλωση:** Αναγνωρίζεται από την απώλεια στην διαύγεια του θρεπτικού υλικού, λόγω ζύμωσης στους λακτόζης.
- **Παραγωγή H₂S:** Αναγνωρίζεται με την ύπαρξη μαύρου χρώματος στον πυθμένα του γυάλινου σωλήνα ή σε όλη τη μάζα του υγρού λόγω παραγωγής H₂S.
- **Παραγωγή αερίου:** Αναγνωρίζεται με την ύπαρξη φυσαλίδων στο εσωτερικό του σωληνάριου Durham και απόθεση αυτού στους την επιφάνεια του υγρού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της λακτόζης.
- **Σχηματισμός ιζήματος:** Αναγνωρίζεται με την εμφάνιση ιζήματος στον πυθμένα του γυάλινου σωλήνα.

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





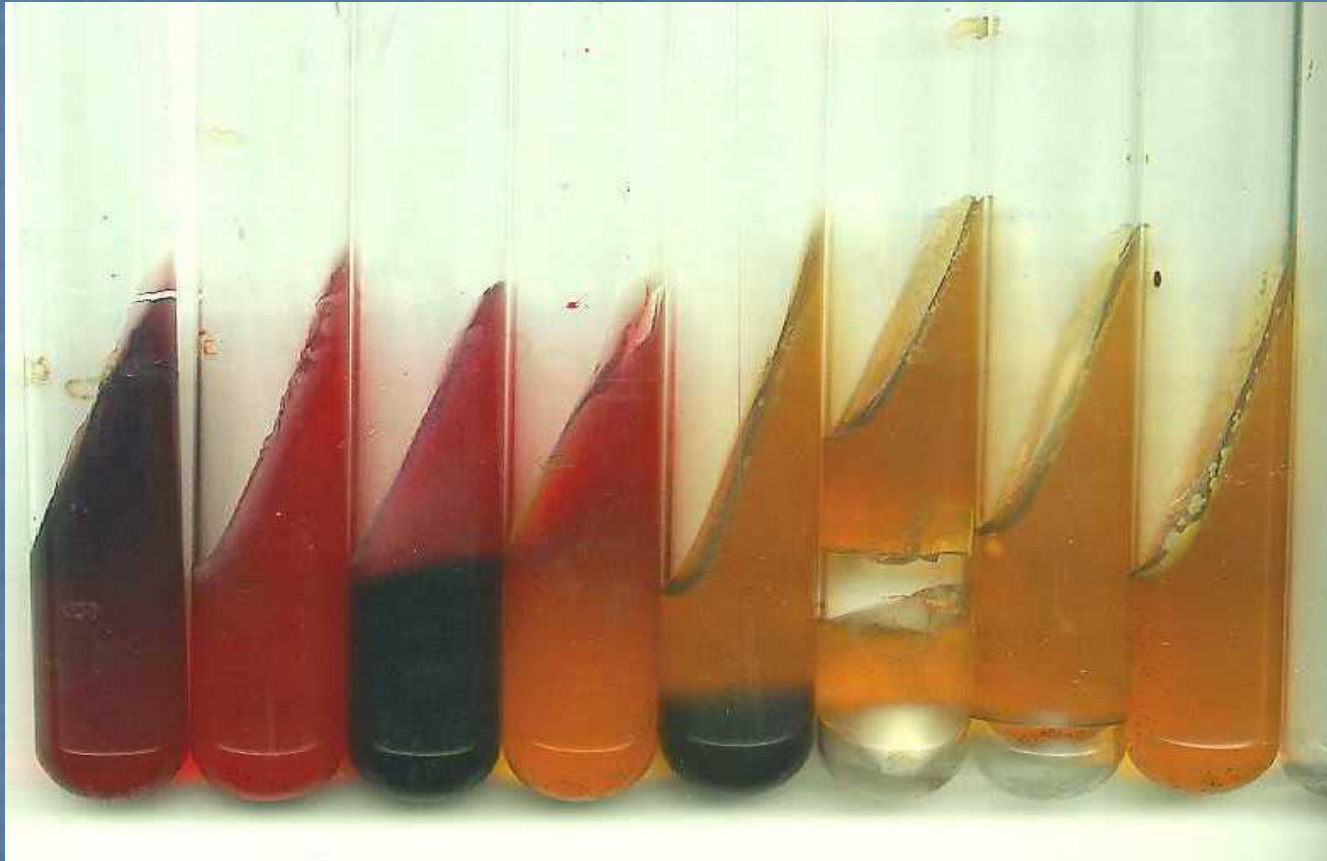


Υποστρώματα

- Medium Lactose – Sulfite
- Brain heart infusion Broth (BHI Broth)
- Blood Agar



Triple Sugar Iron Agar



ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Δοκιμή κινητικότητας





Δοκιμή της ινδολης

- Με τη δοκιμή αυτή διερευνάται η ικανότητα ορισμένων βακτηρίων να αποδομούν το αμινοξύ τρυπτοφάνη προς ινδόλη.
- Ενοφθαλμίζονται σωλήνες με Peptone Water.
- Θετική θεωρείται η δοκιμή όταν η στιβάδα της αμυλικής αλκοόλης πάρει κόκκινο χρώμα.

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



Indole +



Indole -



negative Indole

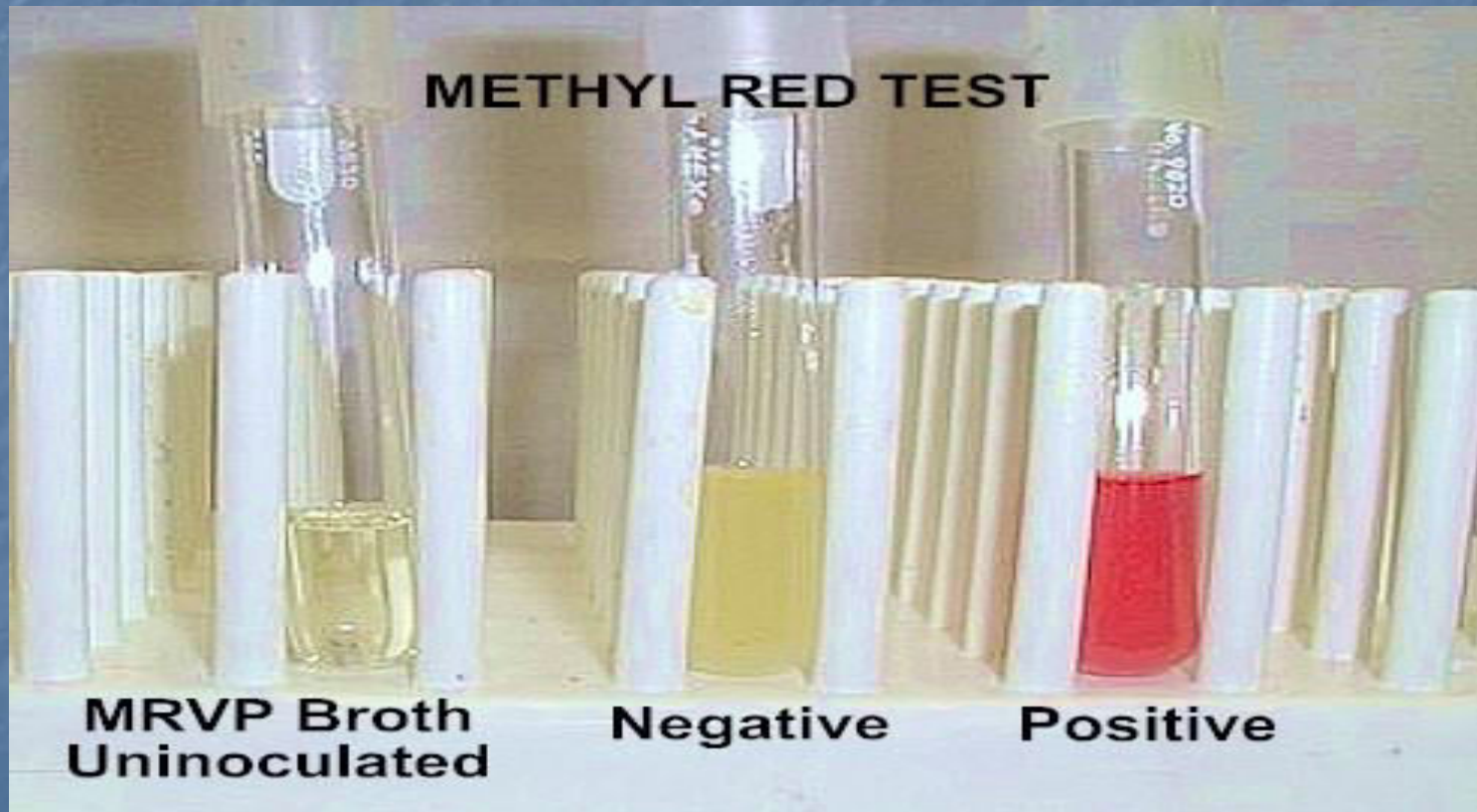
positive Indole



. Δοκιμή του ερυθρού του μεθυλίου(methyl red test).

- Το ερυθρό του μεθυλίου στη δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται απλώς σαν δείκτης pH.
- Ενοφθαλμίζονται σωλήνες οι οποίοι περιέχουν Buffered Glucose Broth (B-13).
- Κόκκινο χρώμα σε όλη την έκταση του υποστρώματος σημαίνει θετική δοκιμή, πορτοκαλί αμφίβολη και κίτρινο αρνητική.

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



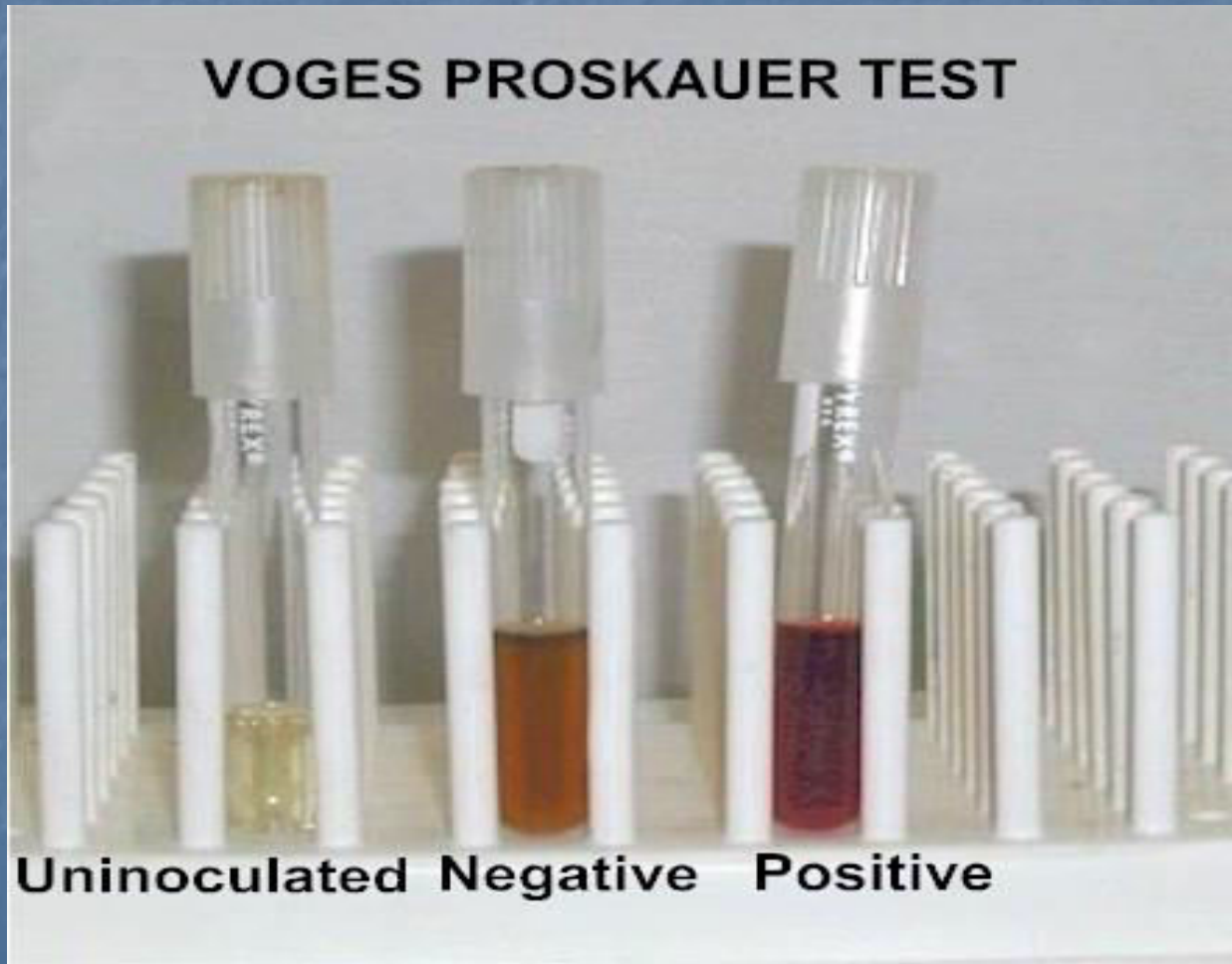
**negative
methy red**



**positive
methy red**



. Δοκιμή Vogues-Proskauer η VP (ανίχνευση ακετοϊνης).



**negative
Voges-Proskauer**



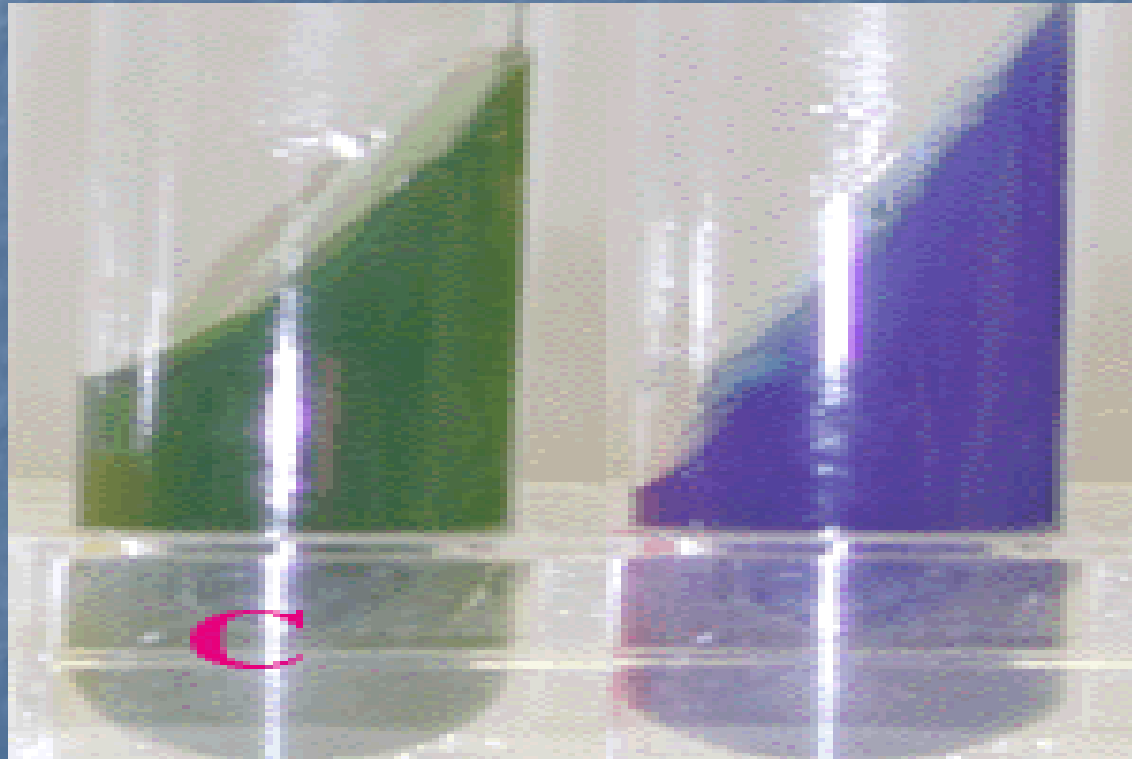
**positive
Voges-Proskauer**



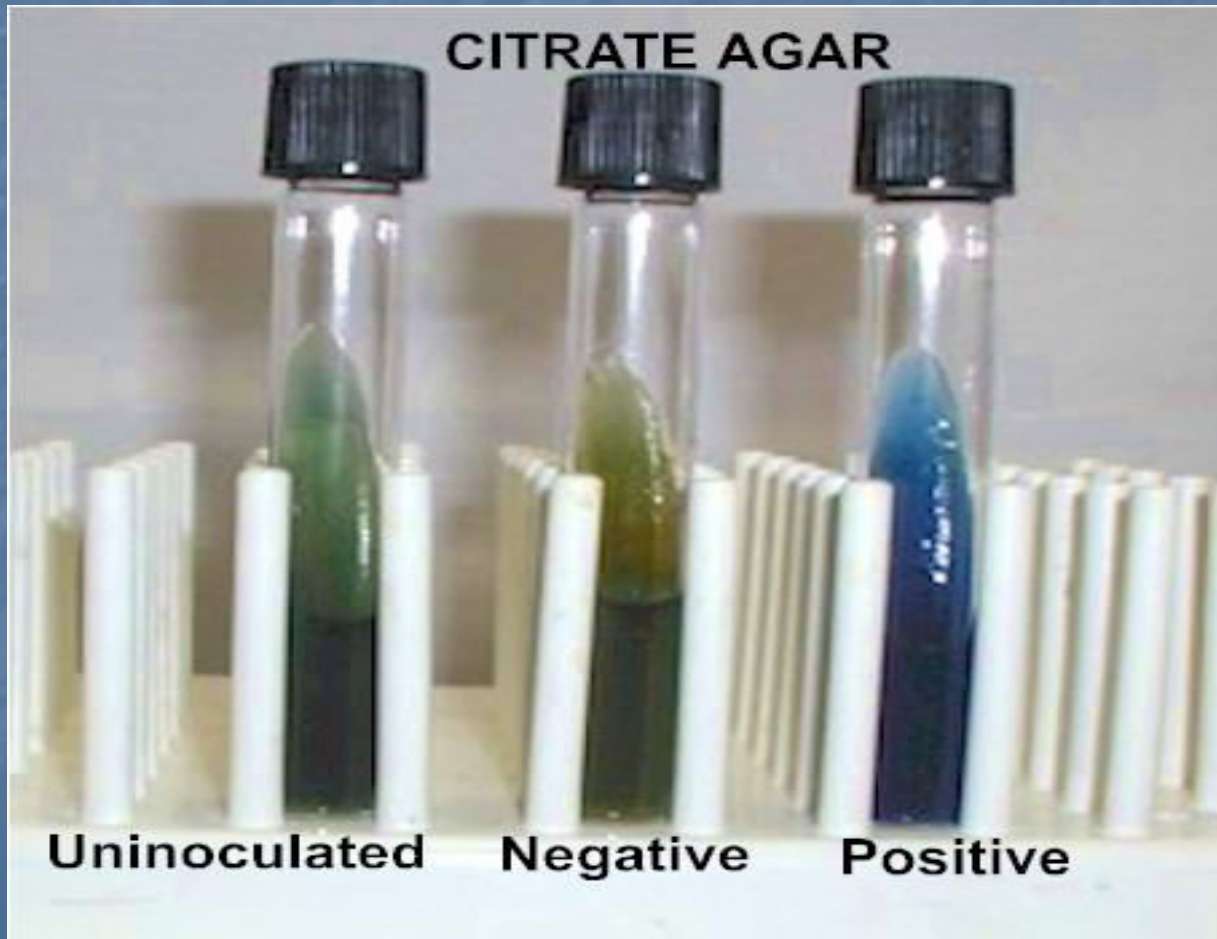
. Δοκιμή κιτρικών αλάτων.

- Με τη δοκιμή αυτή διερευνάται η ικανότητα των βακτηρίων να αξιοποιούν τα κιτρικά άλατα σαν μόνη πηγή άνθρακα και τα άλατα του αμμωνίου σαν μόνη πηγή αζώτου.
- Μέθοδος 1η: Ενοφθαλμίζονται σωλήνες με Koser's Citrate Medium (B-40α) με εναιώρημα του βακτηρίου που εξετάζεται, σε φυσιολογικό ορό.
- Μέθοδος 2η: Ενοφθαλμίζεται η κεκλιμένη επιφάνεια Simmon's Citrate Agar (B- 93) με εναιώρημα βακτηρίων σε φυσιολογικό ορό.

Θετική θεωρείται η δοκιμή όταν παρατηρείται αλλαγή χρώματος του υποστρώματος από πράσινο σε σκούροκυανό. Αρνητικά όταν δεν παρατηρείται αλλαγή χρώματος.



CITRATE AGAR



Uninoculated

Negative

Positive

Δοκιμή παραγωγής ουρεάσης (urease test).

- α) Μέθοδος για υγρά υποστρώματα :
- Γίνεται ενοφθαλμισμός υποστρώματος SSR Medium (B-94) ή Christensen's Urea Broth (B-19), το οποίο επωάζεται στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου.
- β) Μέθοδος για στερεά υποστρώματα :
- Γίνεται ενοφθαλμισμός στην κεκλιμένη επιφάνεια του υποστρώματος Christensen's Urea Medium (B-19), το οποίο επωάζεται στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου.

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.
- Μέθοδος 1η: Ενοφθαλμίζεται υπόστρωμα Lead Acetate Agar.
- Μέθοδος 2η: Ενοφθαλμίζεται Kligler Iron Agar ή Triple Sugar Iron Agar.

Παραγωγή υδρόθειου

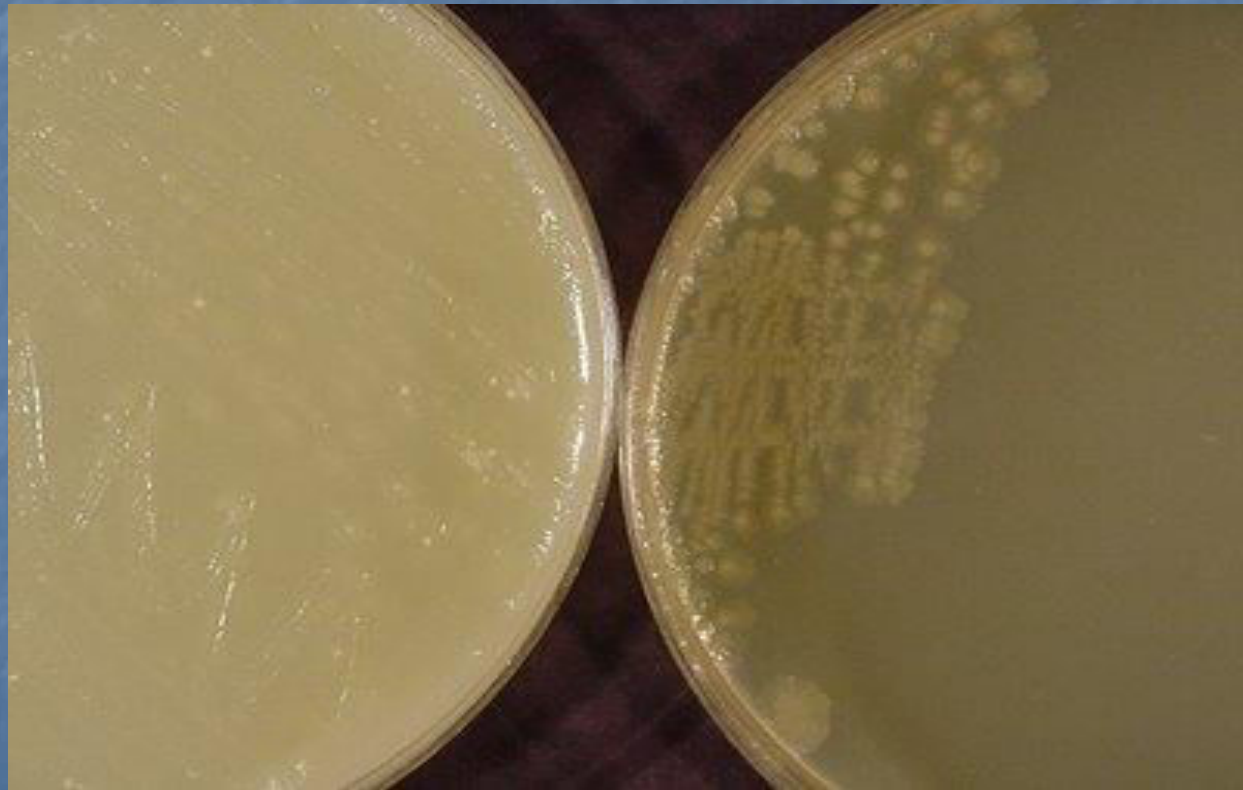


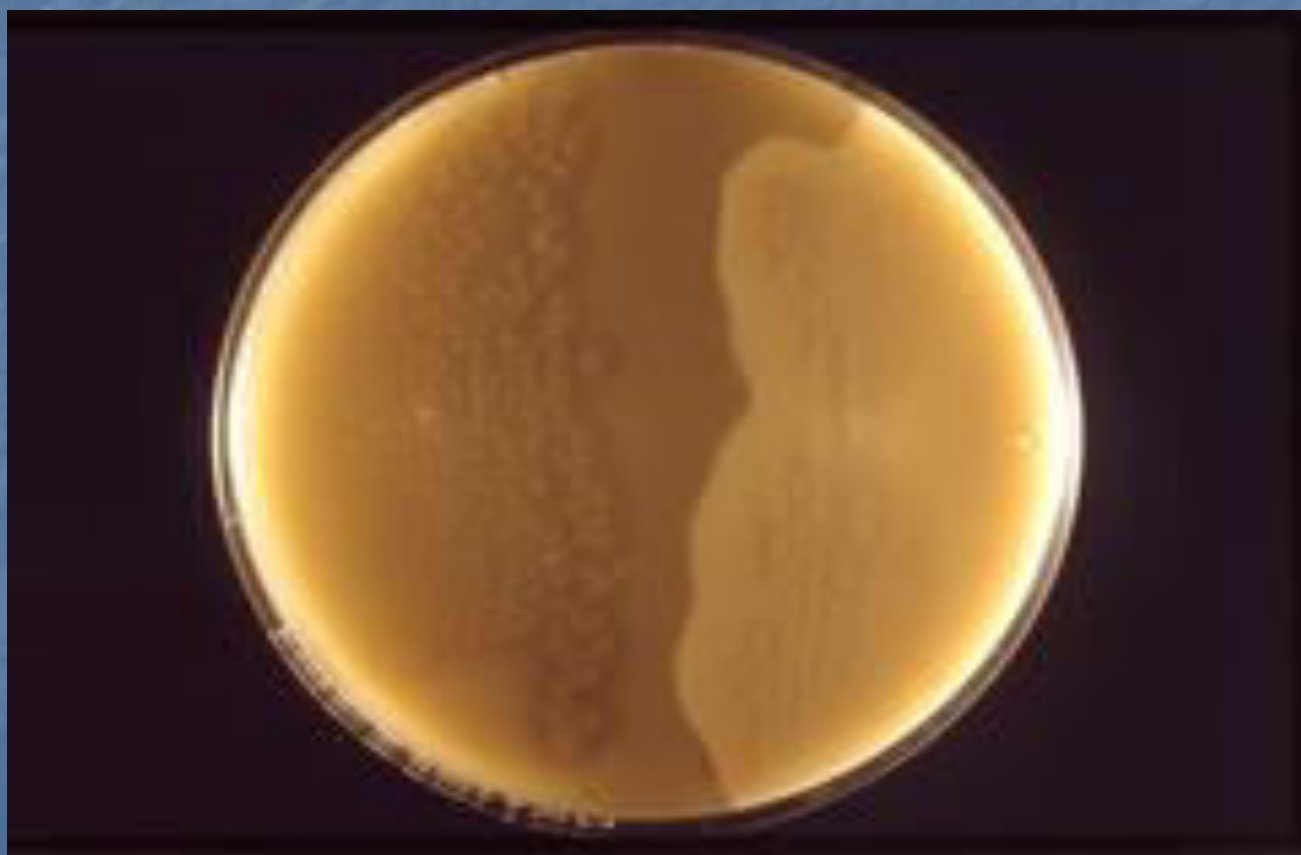


Αντίδραση Nagler (Δοκιμή αναστολής της λεκιθινάσης).

- Χρησιμοποιείται το υπόστρωμα Egg Yolk Agar.
- Το στέλεχος που ελέγχεται στη δοκιμή Nagler εμβολιάζεται σε ευθεία γραμμή αρχίζοντας από την πλευρά που δεν περιέχει αντιτοξίνη.

Σε θετική αντίδραση παρατηρείται θόλωση γύρω από τις αποικίες στην χωρίς τοξίνη πλευρά του τρυβλίου, ενώ η θολερότητα απουσιάζει στη πλευρά με αντιτοξίνη.

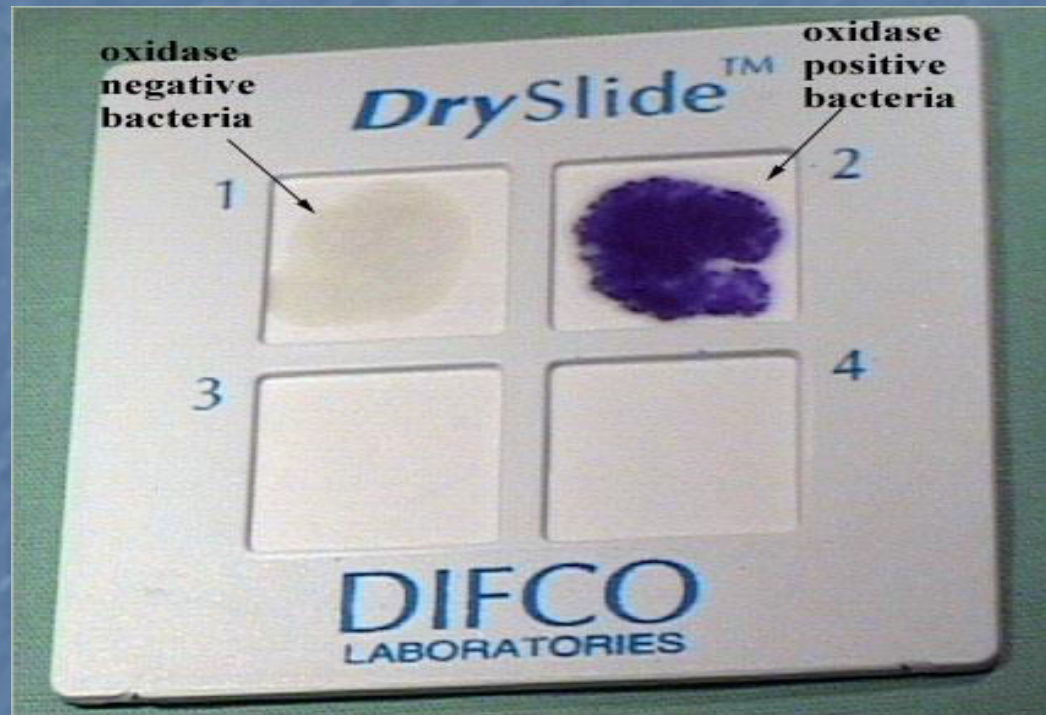




Δοκιμή οξειδάσης.

- Χρησιμοποιείται για την διάκριση μεταξύ των Gram αρνητικών αερόβιων οργανισμών, και άλλων εντεροβακτηριακών (Enterobacteriaceae).
- Πρέπει να είναι άχρωμο η ελαφρά ιώδες.

Δοκιμή οξειδάσης. Στα δεξιά θετική οξειδάση με χρώμα μπλε. Ενώ αριστερά έχουμε οξειδάση αρνητική με χρώμα άσπρο.

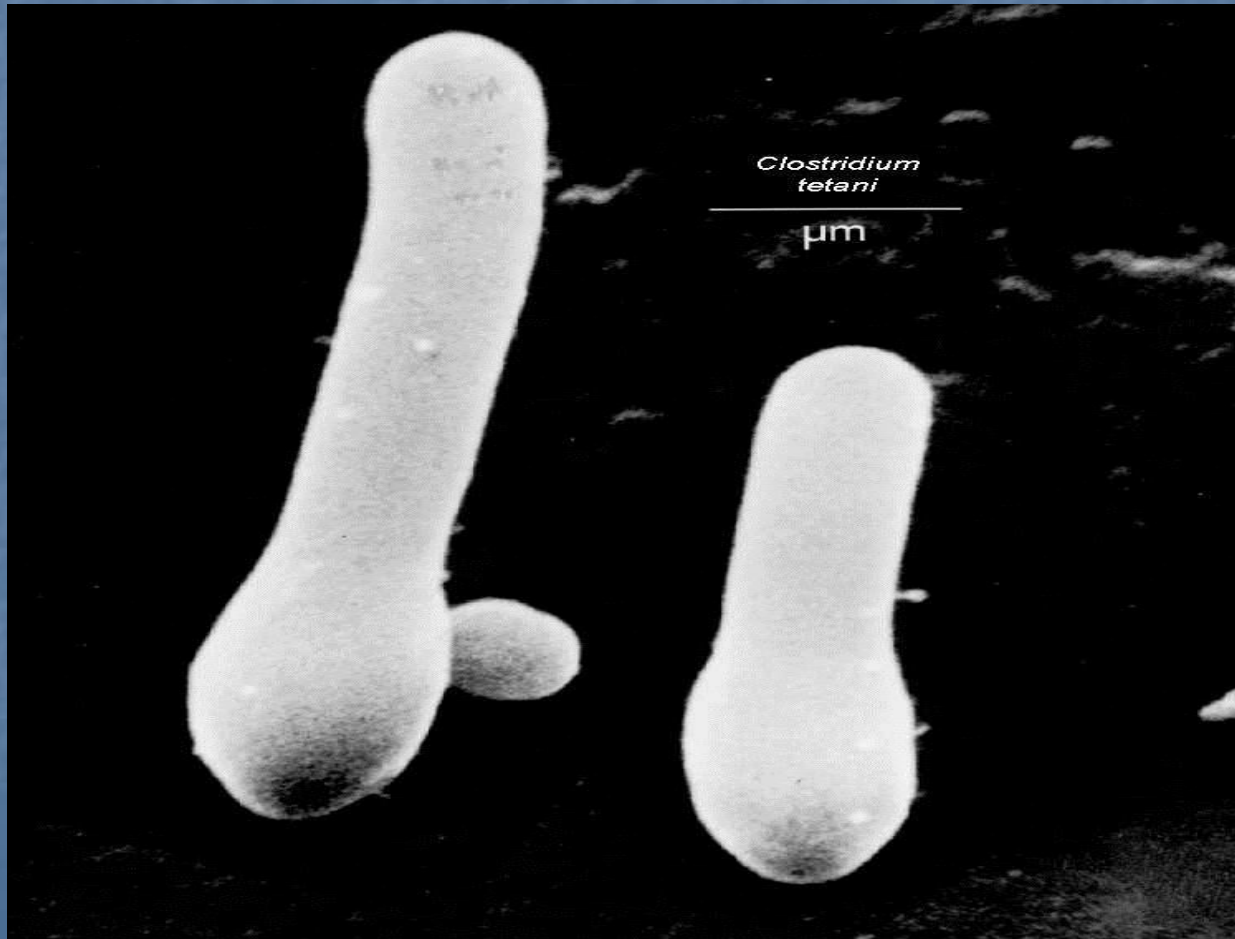


ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΑ ΣΤΑ ΖΩΑ

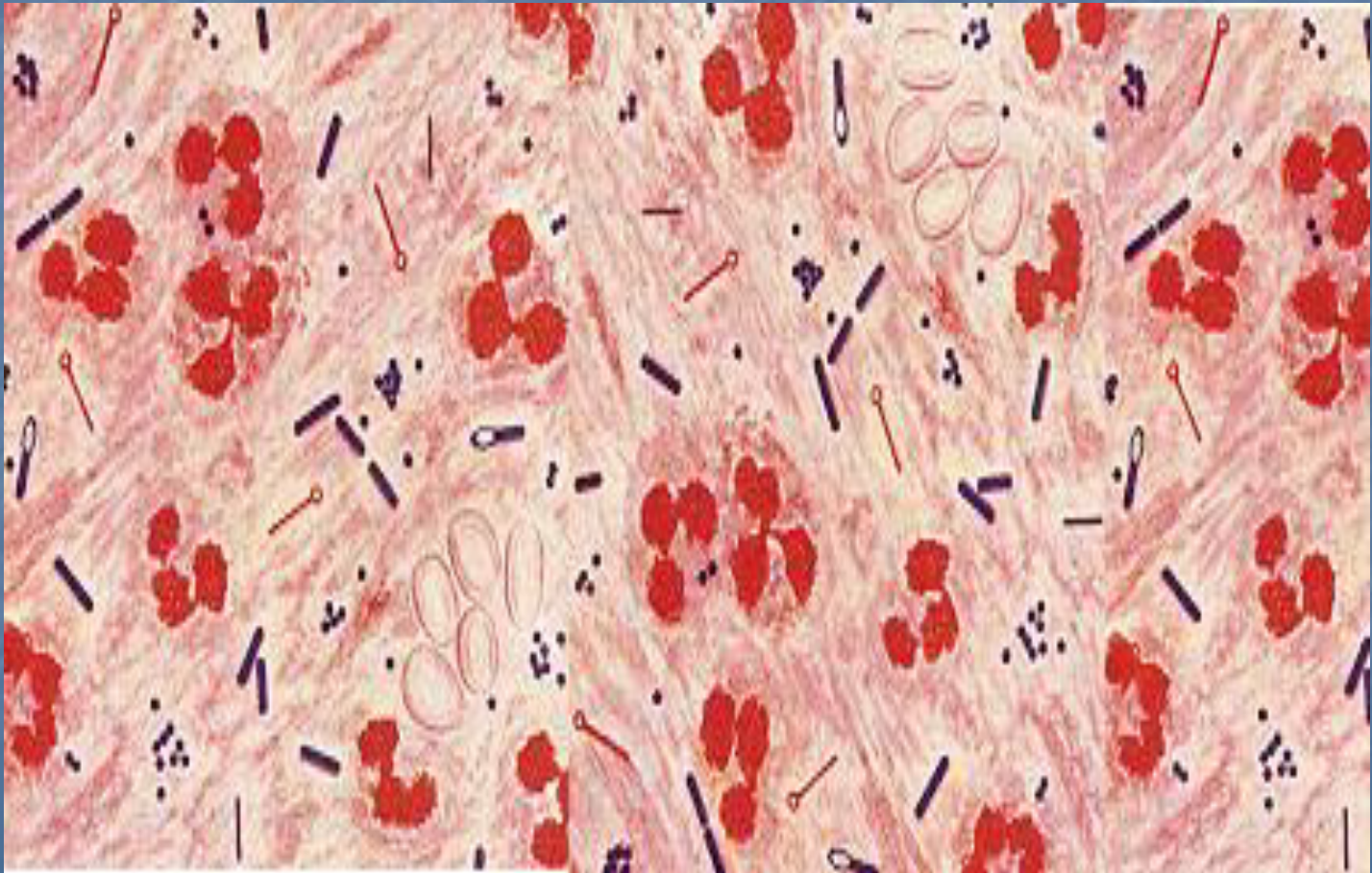
ΤΑ ΠΙΟ ΣΥΝΗΘΙΣΜΕΝΑ ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΑ

- Clostridium tetani.





Clostridium perfringens, welchii.



Γενικευμένη αιμορραγία στον εντερικό σωλήνα
από τοξιναιμία, προσβαλλόμενη από *C. perfringens*.



Clostridium difficile.

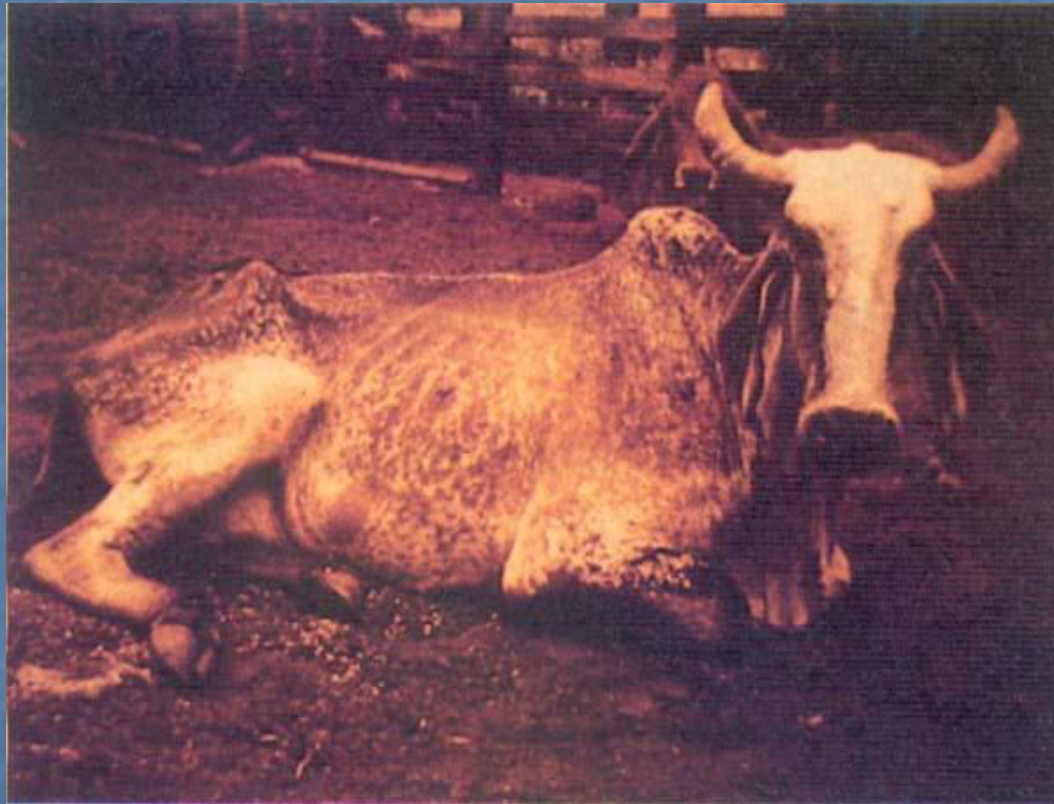
Έχουμε ψευδομεμβρανώδους κολίτιδα



Clostridium difficile.(κιτριννολευκες πλάκες στο βλεννογόνο του κολου.)



Clostridium botulinum (αλλαντίαση).



Νοσήματα που προκαλούνται από Κλωστηρίδια.

- Αεριογονος γάγγραινα.
- Τροφικη δηλητηρίαση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Το βακτήριο Κλωστηρίδιο είναι εντεροβακτήριο και προσβάλλει την υγεία των ζώων και των ανθρώπων, κυρίως βρεφών και ηλικιωμένων
- . Είναι πολύ ανθεκτικό βακτήριο σε ευρύ φάσμα θερμοκρασιών , αναπτύσσεται σε pH 4,5-9 και αντέχει με τις κατάλληλες συνθήκες σε πολλά σημεία και επιφάνειες.
- Η μετάδοση γίνεται μέσω της απεκκριτικής και της στοματικής οδού.
- Με την βοήθεια των ποικίλων βιοχημικών δοκιμών και των υποστρωμάτων που υπάρχουν στην αγορά μπορεί να ταυτοποιηθεί γρήγορα το είδος του βακτηρίου που μας απασχολεί κάθε φορά.
- προσοχή και φροντίδα του χώρου και των επιφανειών όπου εργαζόμαστε καθώς και στο ίδιο το προσωπικό και με τον κατάλληλο εξοπλισμό

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΓΙΑ ΤΗΝ

ΠΡΟΣΟΧΗ ΣΑΣ! ! !