

Izbor podloga za određivanje *Campylobacter jejuni* u sirovom kravljem mlijeku

B. Magdalenić

Prethodno priopćenje — Preliminary communication

UDK: 579.84

Sažetak

Za dobru kvalitetu sirovog kravljeg mlijeka značajno je istraživanje mlijeka i dokazivanje prisustva *Campylobacter jejuni* kao pokazatelja fekalne kontaminacije.

U ovom radu analizirani su uzorci sirovog kravljeg mlijeka uz identifikaciju *Campylobacter jejuni* na podlogama Skirrow i Preston uz prethodno obogaćenje uzoraka.

Rezultati pokazuju da je pogodnija Prestonova podloga s obzirom na to da se radi o prisustvu malog broja *Campylobacter jejuni* u sirovom kravljem mlijeku.

Riječi natuknice: *Campylobacter jejuni* — metode dokazivanja u mlijeku, »Skirrow« i »Preston« podloga, fekalna kontaminacija.

Uvod

Rod *Campylobacter* pripada grupi gram-negativnih bakterija koje u ljudskom organizmu izazivaju akutne gastroenteritise. Oboljenja koja prouzrokuju vrste roda *Campylobacter* nazivaju se kampilobakterioze. U Americi je posljednje vrijeme kampilobakterioza mnogo učestalija od salmoneloza i šigeloza.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da kontaminacija mlijeka vrstama iz roda *Campylobacter* potječu od fekalnih i drugih infekcija. U mlijeku krava s kliničkom dijagnozom mastitisa dokazana je prisutnost *Campylobacter jejuni*. Pored *Campylobacter jejuni* dokazana je i *Escherichia coli* (Larkin et al., 1991.).

Mali broj izoliranih bakterija *Campylobacter jejuni* u sirovom mlijeku tumači se nedovoljnom osjetljivošću metoda kao i svojstvom nekih mikroorganizama da proizvode metabolite koji inhibiraju vrste *Campylobacter* (Beumer et al., 1988.).

Za izolaciju *Campylobacter jejuni* u ovom radu korištene su poznate metode s osiguranim osnovnim uvjetima za rast ove bakterije:

- a) mikroaerofilni uvjeti
- b) temperatura inkubacije 42—43 °C.

Za identifikaciju izoliranih kolonija korištena je sljedeća shema:

- predobogaćenje uzoraka
- izolacija kolonija na diferencijalne i selektivne podloge
- identifikacija izolata korištenjem biokemijskih testova za identifikaciju

Za uzgoj i izolaciju *Campylobacter jejuni* koriste se podloge bogate bjelančevinama i amino kiselinama. Najčešće se koriste baze za krvni, tioglikolatni ili brucela agar u koji se dodaje 5—15% lizirane ili defibrirane krvi ovce ili konja. Mogu se koristiti i podloge koje ne sadržavaju krv već neke druge promotore rasta za *Campylobacter* vrste (Bolton et al., 1984.).

Izolacija bakterije *Compylobacter jejuni* iz nesterilnih uzoraka (u ovom slučaju mlijeka) otežano je zbog mogućnosti prerastanja *Compylobacter jejuni* drugim bakterijama prisutnim u mlijeku. Zbog toga se izolira selektivnom tehnikom filtracije ili preko selektivnih podloga s antibioticima. Naime *Compylobacter jejuni* je otporan na djelovanje nekih antibiotika, koji otežavaju rast drugih bakterija prisutnih u mlijeku. U ovom radu korištene su različite podloge s antibioticima. Tako se u podlogu za uzgoj i izolaciju pored krvi i ostalih sastojaka dodaju i neki od antibiotika u određenim koncentracijama.

Na primjer u podlogu Skirrow dodaju se sljedeći antibiotici u navedenim koncentracijama:

— trimetroprim	2,5 mg
— vankomicin	5,0 mg
— polimiksin B	1250 IU.

U podlogu Preston ovi antibiotici:

— trimetroprim	5,0 mg
— cikloheksimid	50,0 mg
— rifampicin	5,0 mg
— polimiksin B	2500 IU.

Kako se vidi, u podlogama za uzgoj i izolaciju *Campylobacter jejuni* najčešće se dodaju tri antibiotika: rifampicin, polimiksin B i trimetroprim (Ray et al., 1984.).

Kako se pretpostavlja da je mlijeko materijal koji sadržava mali broj *Campylobacter* vrsta, potrebno je uzorke prethodno obogatiti, tj. inkubirati u podlozi za prethodno obogaćenje. Blaser i suradnici (1980.) preporučuju Blaserovu podlogu, a Bolton i suradnici (1982.) preporučuju podlogu s antibioticima uz hranjive dodatke: krv, ekstrakt kvasca ili teleći bujon.

U ovom radu istraženi su uzorci sirovog mlijeka (nefiltriranog), a za obogaćenje i identifikaciju korištene su podloge Skirrow (1977.) i Preston (Bolton, 1982.)

Materijal i metode rada

Analizirani su uzorci sirovog kravljeg mlijeka koji prethodno nisu filtrirani, pa su stoga zapažena i gruba onečišćenja (dlake, slama i sl.). Kako se pretpostavlja da su uzorci sadržavali mali broj *Campylobacter jejuni*, uzorci mlijeka obogaćeni su u podlogama Skirrow (1977.) i Preston, proizvođač »Biolife«, Milano (Bolton, 1982.). Podloga Preston je bila inkubirana dva sata prije dodatka antibiotika.

1 ml uzorka mlijeka dodao se u 10 ml pripremljene podloge za obogaćenje Skirrow i Preston. Inkubacija uzoraka trajala je 48 sati pri 42 °C u posudi za anerobne bakterije proizvođača »Merck«. Mikroaerofilni uvjeti osigurani su »Anaerocultom« C (proizvođač »Merck«): 8—10% CO₂ i 5—7% O₂. Nakon završene inkubacije obogaćeni uzorci cijepljeni su na površinu selektivne čvrste podloge Skirrow (1977.) i Preston proizvođača »Biolife«, Milano (Bolton, 1982.). Cijepljene selektivne podloge inkubirane su 48 sati pri 42 °C u mikroaerofilnim uvjetima. Nakon završene inkubacije tipične mukoidne, sluzave sive, ravne, gram-negativne nehemolitične kolonije identificirane su bioke-mijskim testom prikazanim u Tablici 1.

Tablica 1. Diferencijalni test *Campylobacter jejuni*Table 1. Differential test for *Campylobacter jejuni*

Rod Species	Katalaza test Catalaze test	Oksidaza test Oxidase test	Rast Growth at		Hidroliza hipurata Hippurate hydrolysis
			25°C	42°C	
<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	—	+	+

Rezultati i diskusija

Tablica 2. Prisustvo *Campylobacter jejuni* u sirovom kravljem mlijekuTable 2. *Campylobacter jejuni* in raw cow's milk

Broj uzoraka No of samples	Broj pozitivnih uzoraka Number of positive samples
15	—

- Skirrow bujon za obogaćenje
Skirrow enrichment broth
- Skirrow selektivna podloga
Skirrow plating medium

Tablica 3. Prisustvo *Campylobacter jejuni* u sirovom kravljem mlijekuTable 3. *Campylobacter jejuni* in raw cow's milk

Broj uzoraka No of samples	Broj pozitivnih uzoraka Number of positive samples
15	1

- Preston bujon za obogaćenje
Preston enrichment broth
- Preston selektivna podloga
Preston plating medium

Rezultati prikazani u tablicama 2 i 3 pokazuju da je za izolaciju *Campylobacter jejuni* u uzorku sirovog mlijeka bolje koristiti podloge za obogaćenje »Preston«. Kada su uzorci sirovog mlijeka izolirani u Skirrow podlozi, nije utvrđen ni jedan pozitivan uzorak, dok su obogaćeni uzorci u »Preston« podlozi pokazali jedan pozitivan uzorak. Navedene podloge za obogaćenje razlikuju se po svom sastavu, tj. podloga za predobogaćenje Skirrowa ne sadrži krv, dok podloga Prestona sadržava liziranu krv. Obje selektivne čvrste podloge sadržavaju krv koja prema Frickeru (1987.), osim što služi kao hranjiva sredina, služi i kao neutralizator trimetoprima. Prednost Prestonove podloge za dokazivanje *Campylobacter jejuni* potvrdili su u svojim istraživanjima Bolton sa sur. (1983.).

U literaturi se navode i neke hranjive podloge koje ne sadržavaju krv, ali sadržavaju druge promotore rasta *Campylobacter* vrsta. Rezultati istraživanja (Humphrey et al., 1985.) pokazala su da su bolji rezultati u utvrđivanju prisutnosti malog broja *Campylobacter jejuni* ako se podloga za predobogaćenje inokulira dva sata prije dodatka antibiotika. Rezultati Humphrey i sur. potvrđeni su u ovom radu.

Zaključak

Prema rezultatima istraživanja sirovog (nefiltriranog) mlijeka o prisutnosti *Campylobacter jejuni*, preporuča se Prestonova podloga za obogaćenje. Za identifikaciju *Campylobacter jejuni* takođe treba koristiti Prestonovu čvrstu selektivnu podlogu.

SELECTION OF DETERMINATION MEDIUM FOR CAMPYLOBACTER JEJUNI IN RAW COW'S MILK

Summary

Significant point in evaluation of good quality raw cow's milk in investigation assigned to prove presence of Campylobacter jejuni, indicator of fecal contamination.

In samples of raw cow's milk Campylobacter jejuni was identified using Skirrow and Preston media after preliminary enrichment.

Investigation data indicated Preston medium as better with regard to small number of Campylobacter jejuni present in raw cow's milk.

Additional index words: Campylobacter jejuni — methods of determination in milk, Skirrow and Preston media, fecal contamination.

Literatura

- BREUMER, R. R., CRUYSEN, J. J. M., BRITANTIE, I. R. K. (1988): The occurrence of *Campylobacter jejuni* in raw cow's milk, **Journal of Applied Bacteriology** 65, 93—96.
- BLASER, M. J., HARDESTY, H. L., POWERS, B., WANG, W. L. (1980): Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus, **Journal of Clinical Microbiology** 11, 309—313.
- BOLTON, F. J., COATES, D., HINCHLIFFE, P. M., ROBERTSON, L. (1983): Comparison of selective media for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*, **Journal of Clinical Pathology** 36, 78—83.
- BOLTON, F. J., ROBERTSON, L. (1982): Selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*, **Journal of Clinical Pathology** 35, 462—467.
- BOLTON, F. J., HUTCHINSON, D. N., COATES, D. (1984): Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces, **Journal of Clinical Microbiology** 19, 169—171.
- FRICKER, C. R. (1987): The isolation of *Salmonellae* and *Campylobacter*, **Journal of Applied Bacteriology** 63, 99—116.
- HUMPHREY, T. J., CRUCKSHANK, J. G. (1985): Antibiotic and desoxycholate resistance in *Campylobacter jejuni* following freezing or heating, **Journal of Applied Bacteriology** 59, 65—71.
- LARKIN, L. L., VASAVADA, P. C., MARATH, E. H. (1991): Incidence of *Campylobacter jejuni* in raw milk as related too its quality, **Milchwissenschaft** 46, 7, 428—430.
- RAY, B., JOHNSON, C. (1984): Survival and growth of freezestressed *Campylobacter jejuni* cells in selective media, **Journal of Food Safety** 6, 183—195.
- SKIRROW, M. B. (1977): *Campylobacter enteritis a »new« disease*, **British Medical Journal** (2), 9—11.

Adresa autora — Author's address:
Mr. Branka Magdalenić
Prehrambeno-biotehnoški fakultet
Pierottijeva 6, Zagreb

Primljeno — Received
24. 4. 1992.