

Komparacija metoda određivanja prisutnosti *Salmonella* vrsta u uzorcima mlijeka u prahu

Mr. Branka MAGDALENIĆ, Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu

Znanstvena bilješka — Short communication
Prispjelo: 28. 8. 1991.

UDK: 579.842.1/2

Sažetak

Brzo i pouzdano otkrivanje prisutnosti Salmonella u namirnicama je od velike važnosti s obzirom na posljedice unosa istih u organizam. Prilikom analize namirnica uspješnost izoliranja Salmonella iz kontaminiranog supstrata ovisi o velikom broju faktora.

U ovom radu su se istraživali uzorci obranog mlijeka u prahu umjetno kontaminirani sa Salmonella Virchow, postupcima koje propisuje naš Pravilnik, postupcima Internacionalne komisije za standardizaciju (ISO/DIS) i MUCAP-testom (Biolife).

Rezultati ukazuju da su najpouzdanije hranjive podloge (ISO/DIS metoda) koje omogućavaju razmnožavanje i revitalizaciju Salmonella. Postupak našeg »Pravilnika« u svom pojednostavljenju ne osigurava pouzdane rezultate pogotovo ako je broj Salmonella malen.

Za vremensko skraćanje postupka otkrivanja prisutnosti Salmonella pogodan je MUCAP-test, dok se s velikom pouzdanošću može koristiti metoda ISO-standarda.

Natuknice: Salmonellae u uzorcima mlijeka u prahu. Metode dokazivanja prisutnosti — Pravilnik, ISO/DIS, MUCAP-test.

Uvod

Salmonellae su Gram-negativne vrste mikroorganizama koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae*. Svi predstavnici roda *Salmonella* su patogeni za čovjeka jer izazivaju brojna oboljenja odnosno infekcije uključivši trbušni tifus i paratifus. Do infekcije čovjeka vrstom *Salmonella* dolazi i preko živežnih namirnica. Stoga je veoma važno dokazivanje prisutnosti *Salmonella* vrste u namirnicama.

Izolacija *Salmonella* u namirnicama često je veoma teška (Lieve, 1990). *Salmonellae* mogu biti prisutne u smrtonosnim dozama ili u malom broju zajedno s ostalim mikroorganizmima.

Biokemijsko svojstvo *Salmonella* omogućava lako održavanje i razvijanje u namirnicama jer je namirnica ujedno i pogodan hranjivi supstrat. Njihov rast i razvoj ovisi o brojnim utjecajima (vremenu, pH, stupnju aktivitetu vode), kao i prisustvu ostalih laktoza — enterobakterija (Matić, 1981).

Mnoga istraživanja su pokazala da izolacija *Salmonella* iz nekog supstrata ovisi o fiziološkim i kemijskim svojstvima supstrata, o fiziološkom stanju prisutnih *Salmonellae*, o svojstvima hranjivih podloga, temperaturi inkubacije i pripremi uzorka za analizu.

U ovom radu korištene su poznate metode izoliranja i identifikacije *Salmonella* vrste koje se razlikuju u postupcima predobogaćenja i obogaćenja analiziranih uzoraka. Pravilnik (Sl. list broj 25/1980), ISO/DIS 3565, 1974, i MUCAP-test.

Materijal i metode rada

U okviru komparacije navedenih metoda analizirani su umjetno kontaminirani uzorci obranog mlijeka u prahu s 24 satnom bujonskom kulturom *Salmonellae* Virchow. Uzorci su kontaminirani s 2×10^6 /g i 3×10^7 /g stanica.

Naš Pravilnik (Sl. list broj 25, 1980) predviđa da se na 25 g/ml uzorka dodaje 225 ml selenit bujona, te se inkubira 24 sata (37°C), zatim se ezom zasijava na površinu Wilson-Blairov bizmutsulfit agara. Zasijane ploče inkubiraju se 24—48 sati (37°C). Izrasle kolonije se dalje identificiraju poznatim biokemijskim nizovima.

Prema postupku Internacionalne komisije za standardizaciju (ISO/DIS 3565, 1974) prvo se 25 g/ml uzorka dodaje u 225 ml puferirane peptonske vode i inkubira 20 sati (37°C). Zatim se 10 ml te hranjive podloge za predobogaćenje prenese u 100 ml tetratonat bujona i 100 ml selenit brilliant green bujona. Tetratonat bujon se inkubira 24—48 sati (42 — 43°C), a selenit-brilliant green bujon u uvjetima 37°C . S navedenih hranjivih podloga zasijava se ezom na ploče brilliant green agara ili na površinu SS agara. Dalje se primjenjuje postupak identifikacije *Salmonella* vrste.

MUCAP-test Biolife (Pedro, 1990) koristi specifični reagens za identifikaciju *Salmonella* na primarnim podlogama. Reagens je pripremljen od estera C_8 -atoma konjugiranog s metilumbeliferonom u organskom otapalu. C_8 -atom kao sastojak metilumbeliferona, esterificira C_8 -esterazu (koju posjeduje *Salmonella*) uz oslobađanje metilumbeliferona koji snažno fluorescira kad je izložen Woodovoj svjetiljci (366 μm).

25 g/ml uzorka dodaje se u 225 ml selenit bujona te se inkubira 24 sata (37°C), zatim se po jedna eza zasijava na površinu brilliant green agara ili SS-agara. Ne upotrebljavaju se ploče bizmut-sulfit agara. Nakon inkubacije tipične kolonije se pažljivo pregledaju pod Woodovom svjetiljkom kako bi se potvrdilo da izrasle kolonije ne fluoresciraju. Zatim se dodaje kap navedenog reagensa na svaku koloniju, pričekava 3—5 minuta. Prisustvo plave fluorescencije izložene ploče pod Woodovom svjetiljkom znači pozitivan nalaz prisustva *Salmonella* vrste.

Rezultati i diskusija

Iz rezultata prikazanih u tablici 1. vidljivo je da nije identificirana *Salmonella* u svim uzorcima mlijeka u prahu koji prethodno nisu obogaćeni (metoda Pravilnika i MUCAP-testom), a uzorci su kontaminirani bujonskom kulturom koja je sadržala 2×10^7 /g stanica.

Tablica 2. pokazuje da je *Salmonella* identificirana u svim uzorcima bez obzira na predobogaćenje jer su uzorci kontaminirani kulturom s većim brojem stanica 3×10^7 /g.

Dosadašnjim komparacijama ISO/DIS metoda i metoda Pravilnika (Raguž, 1981) određeni su identični rezultati.

Predobogaćenje uzoraka je značajno pogotovo ako je hrana eventualno kontaminirana malim brojem stanica, jer se tako omogućava razmnožavanje odnosno revitalizacija oštećenih stanica što su dokazala mnogobrojna istraživanja. Kraće trajanje pojedinih metoda važno je zbog preventivnog djelovanja.

Tablica 1. Prisustvo *Salmonella Virchow* u uzorcima obranog mlijeka u prahu (kontaminacija 2×10^1 jedinica koje stvaraju kolonije)

Broj uzoraka	Pravilnik (Sl. list 25/80)		ISO/DIS 3565		MUCAP-test (Biolife)	
	<i>Salmonella</i> positive	<i>Salmonella</i> negative	<i>Salmonella</i> positive	<i>Salmonella</i> negative	<i>Salmonella</i> positive	<i>Salmonella</i> negative
10	9	1	10	—	9	1

Table 1. *Salmonella Virchow* in dry skim milk samples (contamination 2×10^1 CFU/g)

Tablica 2. Prisustvo *Salmonella Virchow* u uzorcima obranog mlijeka u prahu (kontaminacija 3×10^2 jedinica koje stvaraju kolonije)

Broj uzoraka	Pravilnik (Sl. list 25/80)		ISO/DIS 3565		MUCAP-test (Biolife)	
	<i>Salmonella</i> positive	<i>Salmonella</i> negative	<i>Salmonella</i> positive	<i>Salmonella</i> negative	<i>Salmonella</i> positive	<i>Salmonella</i> negative
10	10	—	10	—	10	—

Table 2. *Salmonella Virchow* in dry skim milk samples (contamination 3×10^2 CFU/g)

MUCAP-testu u tom slučaju dajemo prednost koju su potvrdili i rezultati Pontella i sur. (1987). Pravilnik treba dopuniti podlogama koje omogućavaju bolje razmnožavanje *Salmonella* a za veliku sigurnost i pouzdanost analiza koristiti ISO/DIS standarde.

Zaključak

Prema rezultatima istraživanja u ovome radu može se zaključiti:

— za sigurno dokazivanje prisutnosti *Salmonella* vrste u uzorcima obranog mlijeka u prahu s manjim brojem stanica ($2 \times 10^1/g$) treba koristiti ISO/DIS metode;

— metode Pravilnika i MUCAP-test pouzdane su za identifikaciju *Salmonella* vrste u uzorcima mlijeka u prahu s većim brojem stanica ($3 \times 10^2/g$). Prednost MUCAP-testa bi opravdalo kraće trajanje metode.

COMPARISON OF DETECTION METHODS INDICATING PRESENCE OF GENUS SALMONELLA IN DRY SKIM MILK SAMPLES

Summary

Importance of prompt and reliable detection of Salmonella in foodstuffs is connected with possible consequences for consumer in case of infection.

Efficiency in Salmonella isolation from contaminated materials depends on a great deal of circumstances.

*Samples of dry skim milk artificially contaminated with Salmonella Vi-
rchow were studied using methods prescribed in »Book of rooles« (Pravilnik),
those of International Standards Committee (ISO/DIS) and MUCAP-test (Bio-
life).*

According to the results of this study the most reliable growth media were those prescribed in ISO/DIS method being efficient in multiplying and revitalizing Salmonellae.

MUCAP-test is suitable to shorten Salmonella detection procedure. ISO-standards method might be used owing to its extra-ordinary reliability.

Additional index words: Dry skim milk, Salmonella detection, ISO/DIS method, MUCAP-test, method prescribed in »Pravilnik«.

Literatura

- ISO/DIS 3565, 1974.
ISO (TC 34) SC 9, 1977.
LIEVE, S. G. (1990): *Salmonella*-TBk, A Rapid Screening Method for *Salmonella* Species in Food. **Applied and Environmental Microbiology**, 56 (4) 924—927.
MATIĆ, S. (1981): Utjecaj svojstva namirnica, tehnoloških postupaka proizvodnje i uvjeta čuvanja na aktivnost *Salmonella* u namirnicama, *Salmoneloze* i mogućnost njihova sprečavanja, Zbornik radova, Zavod za zaštitu zdravlja grada Zagreba, 154—168.
PEDRO, M. (1990): Rapid Fluorescence Method for Screening *Salmonella* spp. from Enteric Differential Agars. **Journal of Clinical Microbiology**, 56 (1) 148—149.
PONTELLO, M. (1987): Evaluation of a New, Rapid Method (MUCAP test) for the Presumptive Identification of *Salmonella* on Primary Isolation Media. Fifth International Symposium on Rapid Method and Automation in Microbiology and Immunology, Florence.
PRAVILNIK o metodama obavljanja mikrobioloških analiza i superanaliza živežnih namirnica, Službeni list SFRJ broj 25/80.
RAGUŽ, F. (1981): Istraživanje prikladnosti nekih postupaka i hranljivih podloga za izoliranje *Salmonella* iz namirnica. *Salmoneloze* i mogućnost njihova sprečavanja. Zbornik radova, Zavod za zaštitu zdravlja grada Zagreba, 168—177.