

Metode izdvajanja i dokazivanja bakterija roda *Campylobacter* – klasične i molekularne metode (I. dio)



Marina Mikulić*, Andrea Humski, B. Njari, Dora Stojević, L. Jurinović, S. Špičić, Sanja Duvnjak i Ž. Cvetnić

Uvod

Kampilobakterioza je zoonoza prouzročena različitim vrstama bakterija iz roda *Campylobacter*, široko rasprostranjena i važan je uzročnik bolesti ljudi diljem svijeta. Incidencija i učestalost kampilobakterioze ljudi dramatično se povećala u razvijenim i zemljama u razvoju, a osobito u SAD, Europi i Australiji (Kaakoush i sur., 2015.). Bolest se najčešće prenosi hranom, ali prisutni su i drugi načini širenja poput izravnog dodira sa životinjama i prijenosa s osobe na osobu. Utvrđivanjem izvora infekcija i čimbenika rizika bolesti došlo se do zaključka da je nedovoljno toplinski obrađeno pileće meso najčešći izvor infekcije u ljudi, a poznati su i drugi izvori iz okoliša, poput vode, zatim izravni dodir s inficiranim životinja te međunarodna putovanja i nehygijski uvjeti tijekom boravka u tim zemljama (Domingues i sur., 2012.). Vrste *Campylobacter* spp. su najčešći uzrok bakterijskog gastroenteritisa u Europi. Za

razliku od drugih zoonoza podrijetlom iz hrane, incidencija kampilobakterioze u Europi je cijelog prošlog desetljeća bila u porastu. Bolest se često pojavljuje u mlađih ljudi i djece mlađe od 5 godina (Kuhn i sur., 2017.). Prepoznavanje najznačajnijih izvora infekcije i sprječavanje širenja i suzbijanje uzročnika kampilobakterioze važni su ciljevi javnog zdravstva. U našem radu bit će prikazane metode izdvajanja i dokazivanja vrsta bakterija iz roda *Campylobacter*, uz primjenu različitih klasičnih bakterioloških i molekularnih metoda.

Klasične metode izdvajanja i dokazivanja bakterija roda *Campylobacter*

Bakterije roda *Campylobacter* su izbirljive, polako rastuće bakterije koje za rast u laboratorijskim uvjetima zahtijevaju optimalnu temperaturu (37

Dr. sc. Marina MIKULIĆ*, dr. med. vet., poslijedoktorandica, (dopisni autor, e-mail: mikulic@veinst.hr), dr. sc. Andrea HUMSKI, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, naslovna docentica, Dora STOJEVIĆ, dr. med. vet., znanstvena novakinja, dr. sc. Luka JURINOVIĆ, dipl. ing. biol., poslijedoktorand, dr. sc. Silvio ŠPIČIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, dr. sc. Sanja DUVNJAK, mag. biol. mol., poslijedoktorandica, dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. med. vet., akademik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Bela NJARI, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

°C) i mikroaerofilne atmosferske uvjete s približno 5% O₂, 10% CO₂ i 85% N₂ te je njihovo izdvajanje klasičnim metodama u laboratoriju složeno i zahtjeva primjenu visoko selektivnih tekućih i/ili krutih hranjivih podloga. Do danas je razvijen veći broj različitih protokola za izdvajanje, određivanje broja i razlikovanje vrsta bakterija roda *Campylobacter*, primjenjivih u svakodnevnoj dijagnostici, bilo da se radi o fenotipskim, biokemijskim ili molekularnim tehnikama.

Izdvajanje bakterija roda *Campylobacter*

Za izdvajanje traženih bakterija, posebice iz uzoraka s nepoželjnom popratnom mikroflorom, potrebna je primjena visoko selektivnih tekućih i/ili krutih hranjivih podloga. Neke od najčešće upotrebljivanih hranjivih podloga za izdvajanje kampilobaktera jesu: Bolton, Skirrow, Preston, Karmali, mCCDA (Engl. *modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar*), CAT (Engl. *cefoperazone amphotericin teicoplanin*) te Campy-Cefex podloga. Hranjive podloge razlikuju se prema sastavu i sadrže različite kombinacije antimikrobnih sredstava koja onemogućuju rast nepoželjne mikroflora, poput: polimiksina, vankomicina, trimetoprima, rifampicina, cefoperazona, cefalotina, kolistina, cikloheksamida i nistatina. Osim navedenog, hranjive podloge sadrže peptone, a većini se dodaje krv te različite tvari za vezanje slobodnog kisika poput vodikovog peroksida. Više međunarodno priznatih standardiziranih protokola za izdvajanje i identifikaciju kampilobaktera izdano je od uvaženih svjetskih institucija poput ISO (*International Organization for Standardization*), FDA (*US Food and Drug Administration*), NMKL (*Nordic Committee on Food Analysis*), PHLS (*UK Public Health Laboratory Services*), WHO (*World Health Organization*) preporuke, no niti jedan, za sada, nije u cijelosti prihvaćen. Zajednička karakteristika standardiziranih metoda je

u poštivanju nekoliko temeljnih načela važnih za izdvajanje u laboratorijskim uvjetima, a vezano uz prethodnu inkubaciju (oživljavanje) pri 37 °C te daljnju inkubaciju u trajanju do 48 sati pri 42 °C.

Uzorci hrane i okoliša često su onečišćeni kampilobakterima u relativno malom broju zbog čega se pri mikrobiološkoj pretrazi hrane, vode i okolišnih uzoraka provodi postupak namnažanja u svrhu oporavka i rasta traženih bakterija. U rutinskoj laboratorijskoj analitici najčešće su u uporabi sljedeći bujoni za namnažanje: Preston, Bolton, Exeter, Park i Saunders, te CEB (Engl. *Campylobacter enrichment broth*). U rezultatima studije Baylis i sur. (2000.) potvrđene su razlike u učinkovitosti izdvajanja ostvarenog usporedbom Preston, Bolton i CEB bujona te su pokazali kako se najbolji rast kampilobaktera, uz istovremenu učinkovitu inhibiciju popratne bakterijske mikroflora, postiže primjenom Bolton bujona.

Nakon postupka namnažanja u bujonu slijedi supkultivacija na selektivni kruti hranjivi agar. Selektivni agar u svom sastavu može sadržavati krv poput sljedećih agara: Skirrow, Campy-Cefex, Butzler, Preston i Exeter agara, ili je poput mCCD i Karmali agara bez krvi. Sve učestalije se koriste i komercijalno dostupni visoko selektivni kromogeni agari zaštićene tvorničke formule poput: CampyFood ID® (bioMérieux, Francuska) i Brilliance CampyCount® (Oxoid, Velika Britanija) agara. Uporabom ovih agara u laboratorijskoj analitici očitavanje bakterijskog porasta znatno je olakšano u odnosu na mCCD agar zbog njihove kromogene prirode, dok u kombinaciji s namnažanjem u Bolton bujonu ostvaruju i značajno bolje rezultate prilikom samog izdvajanja u odnosu na rezultate dobivenih uporabom kombinacije Preston bujona i/ili mCCD agara (Habib i sur., 2011.). Standardizirane metode,

primjerice one izdane od strane ISO ili FDA, preporučuju naciepljivanje dviju različitih vrsta agara, a nakon bujanskog namnažanja, dok u metodama za određivanje broja *Campylobacter* spp. predviđaju naciepljivanje jedne vrste agara ispitnim dijelom uzorka i daljnjim razrjeđenjima. Pokazalo se da je prilikom enumeracije *Campylobacter* spp. metoda izravnog naciepljivanja na ploče mCCD agara pouzdana alternativa metodi najvjerojatnijeg broja (Engl. *most probable number*; MPN) te je ujedno i pogodnija u rutinskim analitičkim uvjetima zbog brzine i jednostavnosti (Scherer i sur., 2006.).

Identifikacija bakterija roda *Campylobacter*

Nakon porasta karakterističnih kolonija na pločama agara, potrebno je identificirati vrstu termotolerantnih kampilobaktera što zahtijeva uporabu različitih testova. Identifikacija termotolerantnih *Campylobacter* spp. temelji se na mikroskopskim karakteristikama: morfologiji bakterijskih stanica - tipičnom obliku zavojitih ili zakrivljenih štapića, i karakterističnom brzom pokretanju. Najčešće korišteni fenotipski testovi koji omogućuju razlikovanje termotolerantnih vrsta uključuju: biokemijske testove (dokazivanje katalaze, oksidaze, redukcija nitrata, hidroliza hipurata, hidroliza indoksil acetata), testove antibiotičke osjetljivosti - tzv. rezistotipizacija (nalidiksična kiselina, cefalotin) te karakteristični porast ili izostanak rasta pri različitim (25 °C, 37 °C, 42 °C) temperaturnim uvjetima (On, 1996.). Glavni problem koji se pojavljuje pri fenotipskoj karakterizaciji između bakterija *Campylobacter* (*C.*) *jejuni* i *C. coli* jest u tome što pojedini sojevi *C. jejuni* nemaju sposobnost hidrolize hipurata, a njihovo je određivanje osnova za fenotipsko razlikovanje ovih dviju bakterijskih vrsta (On, 2001.). U uporabi su i različiti komercijalni testovi za biokemijsku identifikaciju vrsta bakterija

roda *Campylobacter* poput: API® Campy (bioMérieux, Francuska) te automatizirani sustavi poput: VITEK 2 (bioMérieux, Francuska) koji u vremenskom razdoblju od 6-24 sata može dati podatke o traženoj vrsti mikroorganizama. VITEK2 uređaj radi po načelu otkrivanja metaboličkih promjena pomoću metoda baziranih na fluorescenciji. Uređaj koristi više različitih kolorimetrijskih kartica, ovisno o traženom mikroorganizmu, a za potrebe dokazivanja kampilobaktera koriste se NH (Engl. *Neisseria Haemophilus*) identifikacijske kartice. Za izravnu detekciju *Campylobacter* spp. u životinjskom izmetu ili hrani razvijeni su različiti uređaji i metode koje se temelje na imunoenzimskim načelima, u obliku komercijalno dostupnih kitova poput: VIDAS *Campylobacter* (bioMérieux, Francuska), 3M™ TECRA™ *Campylobacter* (3M, SAD), Ridascreen® *Campylobacter* ELISA (R-Biopharm, Njemačka). Uz navedene metode, za određivanja vrsta kampilobaktera u primjeni je i visokosofisticirana analitička metoda za razdvajanje ioniziranih molekula na osnovu razlike u omjeru mase i naboja: matricom potpomognuta laser desorpcijska ionizacija - vrijeme leta (Engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight*; MALDI-TOF), metoda masene spektrofotometrije, koja u ispitivanjima točnosti daje 100%-tne rezultate prilikom potvrde vrste, no nije u mogućnosti identificirati više vrsta u uzorku miješane bakterijske kulture (Bessède i sur., 2011.).

Zbog razlikovanja serotipova u primjeni su dvije metode serotipizacije - Lior i Penner metoda. Penner metoda predstavlja zlatni standard u serotipizaciji kampilobaktera, a temelji se na toplinski stabilnim (Engl. *heat stable*; HS) antigenima i primjeni tehnike pasivne hemaglutinacije (Penner i sur., 1983.). Lior shema serotipizacije koristi toplinski nepostojane (Engl. *heat labile*; HL) antigene i tehniku aglutinacije bakterija (Lior i sur., 1982.). Pored toga

što su obje metode zahtjevne i dugotrajne, glavni nedostatak je u postojanju velikog broja sojeva koji se ne mogu serotipizirati. Na tržištu su dostupni aglutinacijski kitovi poput Microgen™ *Campylobacter* brzog lateks aglutinacijskog testa za potvrdu i identifikaciju termotolerantnih kampilobaktera (Microgen Bioproducts, Velika Britanija).

Molekularne metode za izdvajanje kampilobaktera

Metoda lančane reakcije polimera- zom (Engl. *Polymerase Chain Reaction*; PCR) omogućuje eksponencijalno umna- žanje traženog odsječka unutar kratkog vremenskog razdoblja *in vitro* te se tako mogu otkriti mikroorganizmi, čak i ako su prisutni u vrlo malom broju. PCR početnice odabrane iz očuvanih regija genoma uobičajeno se koriste u potvrdi primjerice bakterijskog roda, dok se početnice konstruirane iz varijabilnih regija genoma mogu koristiti u razliko- vanju vrsta ili sojeva. Do sada je razvijen značajan broj PCR protokola usmjerenih prema detekciji *Campylobacter* roda, vrste ili podvrste, bilo iz uzoraka hrane, oko- liša ili izmeta. Opisano je više različitih PCR protokola u kojima se koristi jedan par početnica za dokaz bakterija roda *Campylobacter* (Linton i sur., 1996., Inglis i Kalischuk, 2003.), zatim više mnogo- strukih (Engl. *multiplex*) PCR protokola koji pomoću više parova početnica mogu razlikovati više vrsta (Wang i sur., 2002., Klana i sur., 2004., Persson i Olsen, 2005., Yamazaki-Matsune i sur., 2007.) ili kori- ste različite početnice u svrhu razlikova- nja podvrsta (Miller i sur., 2007.). Fermér i Engvall (1999.) opisali su razvoj osjet- ljivog PCR testa koji uključuje enzimsku digestiju PCR produkta s *AluI* i *Tsp509I* restriksijskim enzimima za dokaz ter- motolerantnih *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* i *C. upsaliensis*. Metoda koristi početnice THERM1 i THERM4 temeljene na naj- varijabilnijem dijelu 23S rRNK gena. Re-

striksijski enzimi, odnosno restriksijske endonukleaze, imaju sposobnost cijepa- nja DNK (deoksiribonukleinska kiselina) na specifičnim dijelovima nukleotidnog slijeda poznatih pod nazivom restri- kcijska mjesta. Takvi enzimi opisani su u bakterija i arhea, i smatra su da su dio obrambenog mehanizma protiv invadi- rajućih virusa. *AluI* izdvojen je iz bakte- rije *Arthrobacter luteus* (restriksijska mje- sta: 5'---AG↓CT---3'//3'---TC↑GA---5'), a *Tsp509I* iz bakterija roda *Thermus* (restriksijska mjesta: 5'---N↓AATTN--- 3'//3'---NTTAA↑N---5'). Vrste termoto- lerantnih kampilobaktera mogu se raz- likovati na temelju veličina odsječaka dobivenih cijepanjem enzimima.

Trenutno ne postoji zlatni standard u PCR dijagnostici kampilobaktera, no provedene su studije usmjerene na razvoj međunarodnog standarda za dokazivanje termotolerantnih kampi- lobaktera temeljenog na PCR metodolo- giji (Lübeck i sur., 2003., Josefsen i sur., 2004.). Glavne prednosti PCR metoda su u njihovoj brzini, osjetljivosti i spe- cifičnosti, no problem u njihovoj učin- kovitosti prilikom ispitivanja uzoraka koji nisu čiste bakterijske kulture može se pojaviti zbog prisustva PCR inhibi- tora kao primjerice u uzorcima živo- tinjskog izmeta. Iz tog razloga razvijeni su različiti načini pročišćavanja DNK iz uzoraka izmeta te uzoraka hrane i okoliša. Unatoč primjeni različitih me- toda pročišćavanja i izdvajanja DNK iz okoliša, neke PCR inhibitore nije mogu- će u potpunosti ukloniti iz reakcije, što smanjuje mogućnost otkrivanja kam- pilobaktera prisutnih u malom broju. Prije provođenja PCR postupka, uzorci često prolaze postupak namnažanja in- kubacijom u selektivnom bujonu radi povećanja broja, a što može pridonijeti i razrjeđenju koncentracije PCR inhibito- ra. Važan nedostatak PCR metodologije je u tome što ne razlikuje žive od mr- tvih stanica zbog čega se razvijaju nove metode usmjerene ka otkrivanju RNK

(ribonukleinska kiselina) među kojima su najčešće metoda obrnutog prepisivanja - lančana reakcija polimerazom (Engl. *Reverse Transcriptase PCR*; RT-PCR) te postupak umnažanja baziran na odsječcima nukleinske kiseline (Engl. *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*; NASBA) (Churruca i sur., 2007.). RT-PCR je postupak u kojem se traženi RNK odsječak prvo obrnuto prepisuje u komplementarnu DNK te se dobivena komplementarna DNK umnaža PCR postupkom. NASBA je postupak u kojem se prepisivanje RNK u komplementarnu DNK i PCR događaju u jednom koraku. Za utvrđivanje broja mikroorganizama može se koristiti metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (Engl. *Real Time PCR*), koja se označava kao: QRT-PCR, RT-QPCR ili RRT-PCR. Nogva i sur. (2000.) opisali su QRT-PCR metodu za određivanje broja *C. jejuni* uz uporabu TaqMan probe, dok su Sails i sur. (2003.) usavršili QRT-PCR metodu brojenja *C. jejuni* u hrani nakon postupka namnažanja. Inglis i Kalischuk (2004.) opisuju razvoj ugniježdjenog (od Engl. *nested*) RT-QPCR s uporabom fluorescentne boje SYBR Green za direktno brojanje *C. jejuni* u izmetu stoke. QRT-PCR pretragu za brojenje *C. jejuni* u uzorcima podrijetlom od peradi, mlijeku i uzorcima vode iz okoliša, bez prethodnog namnažanja razvili su Yang i sur. (2003.). Josefsen i sur. (2010.) predstavili su brzi kvantitativni test koji kombinira QRT-PCR uz uporabu PMA (propidij monoazid) - tvari za obradu uzoraka ispiraka pilećih trupova koja prodire kroz oštećene membrane neživih stanica. Ovim testom u manje od tri sata prepoznaje se signal podrijetlom jedino od živih i/ili VBNC (Engl. *viable but nonculturable*) stanica *Campylobacter* spp. s neoštećenom membranom, a ujedno se DNK podrijetlom od neživih stanica kampilobaktera ne otkriva metodom. U laboratorijskoj analitici koriste se i automatizirani komercijalni sustavi poput

BAX® RT-QPCR (DuPont, SAD) za dokaz bakterija roda *Campylobacter* spp. i razlikovanje bakterijskih vrsta *C. jejuni*, *C. coli* i *C. lari* u istom uzorku.

Sažetak

Bakterije roda *Campylobacter* su mikroorganizmi koji za svoj rast u okolišu, kao i u laboratorijskim uvjetima trebaju mikroaerofilne uvjete. Za rutinsku analitiku klasičnim metodama primjerena je primjena priznatih standardiziranih protokola i propisanih visoko selektivnih tekućih i/ili krutih hranjivih podloga. Nakon porasta karakterističnih kolonija radi određivanja vrste kampilobaktera primjenjuju se mikroskopski, fenotipski, biokemijski, imunozimski testovi, rezistotipizacija i/ili metoda masene spektrometrije. Za razlikovanje sojeva kampilobaktera postoje dvije klasične metode serotipizacije. Do sada je razvijen znatan broj PCR protokola usmjerenih prema otkrivanju *Campylobacter* roda, vrste ili podvrste, bilo iz uzoraka hrane, okoliša ili izmeta. Glavne prednosti PCR metoda su u njihovoj brzini, osjetljivosti i specifičnosti, a nedostatak PCR metodologije je u tome što ne razlikuje žive od mrtvih stanica, zbog čega se razvijaju novi protokoli bazirani na RT-PCR, NASBA i QRT-PCR molekularnim metodama.

Ključne riječi: *Campylobacter* spp., izdvajanje bakterija, dokaz vrste, standardizirane metode, PCR

Literatura

1. BAYLIS, C. L., S. MACPHEE, K. W. MARTIN, T. J. HUMPHREY and R. P. BETTS (2000): Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *J. Appl. Microbiol.* 89, 884-891.
2. BESSÈDE, E., O. SOLECKI, E. SIFRÉ, L. LABADI and F. MÉGRAUD (2011): Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1735-1739.
3. CHURRUCA, E., C. GIRBAU, I. MARTÍNEZ, E. MATEO, R. ALONSO and A. FERNÁNDEZ-ASTORGA (2007): Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken meat samples by real-time nucleic acid sequence-based amplification with molecular beacons. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 85-90.
4. DOMINGUES, A. R., S. M. PIRES, T. HALASA and T. HALD (2012): Source attribution of human

- campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiol. Infect.* 140, 970-981.
5. FERMÉR, C. and E. O. ENGVALL (1999): Specific PCR Identification and Differentiation of the Thermophilic Campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3370-3373.
 6. HABIB, I., M. UYTENDAELE and L. DE ZUTTER (2011): Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. *Food Microbiol.* 28, 1117-1123.
 7. INGLIS, G. D. and L. D. KALISCHUK (2003): Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3435-3447
 8. INGLIS, G. D. and L. D. KALISCHUK (2004): Direct quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae* in feces of cattle by real-time quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2296-2306.
 9. JOSEFSEN, M. H., P. S. LÜBECK, F. HANSEN and J. HOORFAR (2004): Towards an international standard for PCR-based detection of foodborne thermotolerant campylobacters: interaction of enrichment media and pre-PCR treatment on carcass rinse samples. *J. Microbiol. Meth.* 58, 39-48.
 10. JOSEFSEN, M. H., C. LÖFSTRÖM, T. B. HANSEN, L. S. CHRISTENSEN, J. E. OLSEN and J. HOORFAR (2010): Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5097-5104.
 11. KAAKOUSH, N. O., N. CASTAÑO-RODRÍGUEZ, H. M. MITCHELL and S. M. MAN (2015): Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 687-720.
 12. KLENA, J. D., C. T. PARKER, K. KNIBB, J. C. IBBITT, P. M. L. DEVANE, S. T. HORN, W. G. MILLER and M. E. KONKEL (2004): Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotidesequence of the lipid A gene *lpxA*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5549-5557.
 13. KUHN, K. G., E. M. NIELSEN, K. MØLBAK and S. ETHELBERG (2017): Epidemiology of campylobacteriosis in Denmark 2000-2015. *Zoon. Pub. Health*, doi:10.1111/zph.12367.
 14. LINTON, D., R. J. OWEN and J. STANLEY (1996): Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Res. Microbiol.* 147, 707-718.
 15. LIOR, H., D. L. WOODWARD, J. A. EDGAR, L. J. LAROCHE and P. GILL (1982): Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J. Clin. Microbiol.* 15, 761-768.
 16. LÜBECK, P. S., P. WOLFFS, S. L. W. ON, P. AHRENS, P. RÅDSTRÖM and J. HOORFAR (2003): Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant campylobacters: assay development and analytical validation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5664-5669.
 17. MILLER, W. G., C. T. PARKER, S. HEATH and A. J. LASTOVICA (2007): Identification of genomic differences between *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *C. jejuni* subsp. *doylei* at the *nap* locus leads to the development of a *C. jejuni* subspeciation multiplex PCR method. *BMC Microbiology* 7, doi:10.1186/1471-2180-7-11.
 18. NOGVA, H. K., A. BERGH, A. HOLCK and K. RUDI (2000): Application of the 59-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4029-4036.
 19. ON, S. L. W. (1996): Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 405-422.
 20. ON, S. L. W. (2001): Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *J. Appl. Microbiol.* 90, 1-15.
 21. PENNER, J. L., J. N. HENNESSY and R. V. CONGI (1983): Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2, 378-383.
 22. PERSSON, S. and K. E. P. OLSEN (2005): Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J. Med. Microbiol.* 54, 1043-1047.
 23. SAILS, A. D., A. J. FOX, F. J. BOLTON, D. R. WAREING and D. L. GREENWAY (2003): A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1383-1390.
 24. SCHERER, K., E. BARTELT, C. SOMMERFELD and G. HILDEBRANDT (2006): Comparison of different sampling techniques and enumeration methods for the isolation and quantification of *Campylobacter* spp. in raw retail chicken legs. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 115-119.
 25. WANG, G., C. G. CLARK, T. M. TAYLOR, C. PUCKNELL, C. BARTON, L. PRICE, D. L. WOODWARD and F. G. RODGERS (2002): Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4744-4747.
 26. YAMAZAKI-MATSUNE, W., M. TAGUCHI, K. SETO, R. KAWAHARA, K. KAWATSU, Y. KUMEDA, M. KITAZATO, M. NUKINA, N. MISAWA and T. TSUKAMOTO (2007): Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.* 56, 1467-1473.
 27. YANG, C., Y. JIANG, K. HUANG, C. ZHU and Y. YIN (2003): Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38, 265-271.

Methods for the isolation and identification of bacteria of the genus *Campylobacter* - classical and molecular methods (Part I)

Marina MIKULIĆ, DVM, PhD, Post-doctoral Researcher, Andrea HUMSKI, DVM, PhD, Scientific Advisor, Assistant Professor, Dora STOJEVIĆ, DVM, Young Researcher, Luka JURINOVIĆ, MSc. Biol., PhD, Post-doctoral Researcher, Silvio ŠPIČIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Sanja DUVNJAK, MSc. Mol. Biol., PhD, Post-doctoral Researcher, Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Academician, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Bela NJARI, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia

Bacteria of the genus *Campylobacter* require microaerophilic conditions for growth. Use of recognized standardized protocols and prescribed highly selective liquid and/or solid media is appropriate for routine analysis with classical methods. After the growth of characteristic colonies, microscopic, phenotype and biochemical methods, immunoenzyme tests, resistotyping and/or mass spectrometry are applied to determine the *Campylobacter* species. Two classical serotyping methods are used to differentiate *Campylobacter* strains. There are various

PCR protocols intended for the detection of *Campylobacter* genus, species or subspecies from food samples, environment or faeces. The main advantages of PCR methods are their speed, sensitivity and specificity. The deficiency of this method is that it does not differentiate viable from dead cells, therefore new protocols based on RT-PCR, NASBA and QRT-PCR molecular methods are under development.

Key words: *Campylobacter* spp., bacterial isolation, species determination, standardized methods, PCR