

KRZYSZTOF KWIATEK, RAFAŁ ZASADNY

OCENA POŻYWEK STOSOWANYCH W WYKRYWANIU OBECNOŚCI ORAZ OZNACZANIU LICZBY *CAMPYLOBACTER SPP.* W MIĘSIE DROBIOWYM

Streszczenie

Celem pracy była ocena przydatności płynnych pożywek selektywno-namnażających (bulionu Prestona, Boltona) i namnażających (bulionu Brucella) oraz pożywek stałych (mCCDA, Karmali) do wykrywania obecności oraz oznaczania liczby termotolerancyjnych *Campylobacter spp.* Do badań jakościowych użyto tuszek drobiowych, z których pobierano metodą wymazów z powierzchni materiał do posiewu na badane pożywki agarowe. Natomiast, celem uzyskania próbek do badań ilościowych zastosowano zmywanie powierzchni tuszki przy użyciu zbuforowanej wody peptonowej.

Doświadczenie przeprowadzono w trzech układach modelowych, obejmujących ocenę pożywek płynnych i stałych stosowanych w metodach jakościowych oraz ocenę pożywek stałych używanych w metodach ilościowych, zgodnie z metodyką własną oraz zalecaną w normie PN-ISO 10272: 2002. W wyniku badań jakościowych z zastosowaniem płynnych pożywek selektywno-namnażających uzyskano wysoki odsetek próbek dodatnich w przypadku bulionu Boltona (100%) i Prestona (94%). Natomiast w przypadku nieselektywnego bulionu Brucella osiągnięto znacznie niższy poziom, wynoszący 47%. Analiza wymazów pobranych z tuszek drobiu z zastosowaniem pożywek stałych mCCDA oraz Karmali pozwoliła na otrzymanie odpowiednio 100% do 94% wykrytych *Campylobacter spp.* Niższy odsetek prawdopodobnie spowodowany był większym wzrostem mikroflory niespecyficzej (35% do 23%, odpowiednio w przypadku agaru Karmali oraz mCCDA). Uzyskane wyniki pozwalają więc na stwierdzenie, że w przypadku badania mięsa drobiowego w zakresie wykrywania i oznaczania liczby *Campylobacter spp.* najlepszymi parametrami charakteryzowały się: selektywno-namnażająca pożywka płynna wg Boltona oraz agar selektywny mCCDA.

Słowa kluczowe: *Campylobacter*, agar mCCDA, agar Karmali, bulion Prestona, bulion Boltona, mięso drobiowe

Wprowadzenie

Wdrażane w laboratoriach systemy zapewnienia jakości badań wymagają stosowania odpowiedniej jakości pożywek i odczynników [6, 7, 8]. Szczególnie podkreśla się, że pożywki stosowane w badaniach mikrobiologicznych żywności i pasz

Doc. dr hab. K. Kwiatek, mgr R. Zasadny, Zakład Higieny Środków Żywności Zwierząt, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

powinny odpowiadać określonym kryteriom żywności oraz selektywności, powinny być dobrane we właściwy sposób, odpowiedni do osiągnięcia celu badania oraz gwarantować uzyskiwanie stałych i powtarzalnych wyników [6]. W wykonywanych urzędowo badaniach mikrobiologicznych żywności w kierunku obecności i liczby termotolerancyjnych *Campylobacter* spp. jednym z ważniejszych elementów decydujących o wiarygodności otrzymanego wyniku jest rodzaj pożywek stosowanych do izolowania, oznaczania liczby i identyfikacji tych drobnoustrojów. Zagadnienie to w ostatnim okresie jest przedmiotem zainteresowania badaczy [1, 2, 3, 4, 5].

Biorąc pod uwagę zakres stosowania pożywek do wykrywania obecności i oznaczaniu liczby termotolerancyjnych *Campylobacter* spp. w żywności można stwierdzić, że pożywki te powinny:

- zapewniać ożywanie uszkodzonych komórek *Campylobacter* spp., które cechują się wysoką wrażliwością na niekorzystne warunki środowiska zewnętrznego oraz mają w tym stanie małą aktywność fizjologiczną;
- umożliwiać ich intensywne namnażanie;
- zapewniać izolowanie tego patogena z różnego rodzaju badanej żywności;
- w przypadku pożywek agarowych umożliwiać oznaczanie liczby termotolerancyjnych *Campylobacter* spp. w badanych próbkach.

Biorąc powyższe pod uwagę podjęto badania, których celem było określenie przydatności wybranych selektywnych pożywek płynnych i agarowych do wykrywania oraz oznaczania liczby termofilnych *Campylobacter* spp. w próbkach materiału pobranych z mięsa drobiowego.

Materiał i metody badań

W badaniach określających selektywność i czułość stałych pożywek agarowych stosowano dwie pożywki, a mianowicie agar wg Karmali oraz zmodyfikowaną pożywkę agarową z węglem drzewnym, cefoperazonem i dezoksycholanem (mCCDA). W badaniach stosowano gotowe komercyjne pożywki wyprodukowane przez firmę Oxoid. Dokładny skład stosowanych pożywek agarowych zawarty jest w odpowiednich normach oraz katalogach [7, 8, 9]. W trakcie przygotowywania pożywek do badań przestrzegano instrukcji producenta. W badaniach prowadzonych w kierunku obecności termotolerancyjnych drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter* stosowano pożywki selektywno-namnażające tj.: bulion Prestona, bulion Boltona oraz nieselektywną pożywkę bulionową Brucella. Atmosferę mikroaerofilną otrzymywano za pomocą gotowego zestawu CampyGen CN 35 firmy Oxoid.

Wykonywane badania laboratoryjne z użyciem ww. pożywek stałych i płynnych prowadzono w 3 układach modelowych.

Ocena pożywek stałych. Metoda jakościowa

Wymazy pobierano z powierzchni tuszek, po wykonaniu zabiegu wytrzewiania na linii uboju, z okolicy steku z powierzchni około 100 cm². Po pobraniu materiału wymazówki umieszczano w probówce zawierającej płyn fizjologiczny, a następnie transportowano w temp. 0–5°C do laboratorium celem niezwłocznego dokonania posiewów. W każdym przypadku czas pomiędzy pobraniem wymazu a posiewem nie przekraczał 4 h. Każdy wymaz był posiewany równolegle techniką sektorkową na pożywki, będące przedmiotem oceny. Po inkubacji posiewów w temp. 42°C przez 48 h w atmosferze mikroaerofilnej (5% O₂, 10% CO₂ i 85% N₂) płytki odczytywano, określając obecność termofilnej mikroflory z rodzaju *Campylobacter* oraz innych niespecyficznym drobnoustrojów przynależnych do innych grup taksonomicznych niż *Campylobacter*.

Ocena pożywek stałych. Metoda ilościowa

Z linii technologicznej uboju drobiu w zakładach drobiarskich pobierano losowo tuszki kurcząt brojlerów po wytrzewieniu, ale jeszcze przed etapem schładzania. Po umieszczeniu badanej tuszki w jałowym worku foliowym dodawano 500 ml zbuforowanej wody peptonowej. Następnie przeprowadzano 2-minutowe zmywanie powierzchni tuszki zanurzonej w dodanym do worka płynie. Po wykonaniu tej czynności tuszkę wyjmowano, a pozostały po ocieknięciu w worku płyn traktowano jako popłuczyny służące do wykonania posiewów. Przedtem jednak przelewano go do jałowych butelek o poj. 500 ml, po czym transportowano w temp. 0–5°C do laboratorium. Po dostarczeniu do laboratorium materiał posiewano, stosując technikę posiewu powierzchniowego. Polegała ona na dokonaniu posiewu badanej próbki oraz jej kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych na płytki Petriego, zawierające poddawane ocenie selektywne pożywki agarowe. Posiewano po 0,2 ml materiału na każdą płytkę, równomierne rozprowadzając po całej powierzchni.

Po inkubacji posiewów w temp. 42°C przez 48 h w atmosferze mikroaerofilnej (5% O₂, 10% CO₂ i 85% N₂) płytki odczytywano, określając liczbę wyrosłych kolonii bakterii termofilnych drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter*. Następnie, po wykonaniu odczytu dokonywano porównania dwóch pożywek agarowych. W tym celu zastosowano test t-Studenta na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ za pomocą programu KyPlot 2.0 (Koichi Yoshioka).

Ocena pożywek płynnych selektywno-namnażających. Metoda jakościowa

Do badań użyto wymazów pobranych z powierzchni tuszek poddanych zabiegowi wytrzewiania i immersyjnego schładzania. Wymazy pobierano z okolicy steku z powierzchni około 100 cm². Po pobraniu materiału wymazówki umieszczano w probówce zawierającej 10 ml płynu fizjologicznego, a następnie transportowano w temp.

0–5°C do laboratorium celem niezwłocznego dokonania posiewów. Otrzymaną zawiesinę po wymieszaniu posiewano po 1 ml do dwóch płynnych pożywek selektywno-namnażających: pożywki bulionowej wg Prestona oraz pożywki bulionowej wg Boltona. Posianą pożywkę Prestona inkubowano w warunkach mikroaerofilnych (5% O₂, 10% CO₂ i 85% N₂) w temp. 41,5°C przez 24 h. W przypadku pożywki bulionowej wg Boltona inkubację prowadzono początkowo w temp. 32°C przez 4 h, a następnie w temp. 41,5°C przez 42 h. Po zakończeniu inkubacji dokonywano przesiewu otrzymanych hodowli bulionowych na pożywkę agarową mCCDA. Po inkubacji posianej pożywki agarowej w temp. 42°C przez 48 h w atmosferze mikroaerofilnej (5% O₂, 10% CO₂ i 85% N₂) płytki odczytywano, określając obecność termofilnej mikroflory z rodzaju *Campylobacter* oraz innych niespecyficznym drobnoustrojów nie należących do rodzaju *Campylobacter*.

Wyniki i dyskusja

Wyniki dotyczące wykrywalności i oznaczonej liczby termofilnych drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter* na powierzchni badanych tuszek drobiu w zależności od rodzaju zastosowanej pożywki agarowej przedstawiono w tab. 1–3.

Tabela 1

Wykrywanie *Campylobacter spp.* w wymazach pobranych z tuszek drobiu w zależności od rodzaju pożywki stałej.

Detection of *Campylobacter spp.* from swab samples taken from poultry carcasses depending on usage of solid medium.

Rodzaj pożywki Medium	Liczba zbadanych wymazów No. of swabs examined	Liczba/odsetek próbek dodatnich [%] Number/percentage of positive samples [%]	
		<i>Campylobacter spp.</i>	Mikroflora niespecyficzna Non-specific microflora
mCCDA	17	17/100	4/23
agar Karmali Karmali agar	17	16/94	6/35

Przy użyciu pożywki mCCDA możliwe było wykrycie obecności termotolerancyjnych *Campylobacter spp.* w 100% badanych próbek wymazów, podczas gdy przy zastosowaniu agaru wg Karmali osiągnięto wskaźnik nieznacznie niższy, wynoszący 94% (tab. 1). Ten niższy odsetek próbek dodatnich spowodowany był nieznacznie niższą selektywnością pożywki. Objawiało się to liczniejszym wzrostem mikroflory niespecyficzej, która najwidoczniej powodowała przerośnięcie wyrosłych kolonii *Campylobacter spp.* Posiewane wymazy na agarze Karmali w 35% zanieczyszczone były mikroflorą niespecyficzną, podczas, gdy w przypadku pożywki

mCCDA odsetek ten wynosił tylko 23%. W badaniach porównawczych testowanych pożywek, na agarze mCCDA uzyskano wyższą liczbę *Campylobacter spp.* niż na stałej pożywce Karmali (tab. 2), jednak stwierdzone różnice nie były na tyle duże, aby były statystycznie istotne.

Tabela 2

Zanieczyszczenie *Campylobacter spp.* powierzchni tuszek drobiowych.
Campylobacter spp. occurrence on the surface of poultry carcasses.

Rodzaj pożywki Medium	Liczba zbadanych tuszek No. of carcasses examined	Zakres jtk/tuszkę Cfu range/carcass	Średni poziom zanieczyszczenia tuszki [jtk/tuszkę] Mean level of carcass contamination [cfu/carcass]
mCCDA	9	$2,43 \times 10^6 - 3,97 \times 10^7$	$1,56 \times 10^7$
agar Karmali Karmali agar	9	$2,74 \times 10^6 - 3,71 \times 10^7$	$1,42 \times 10^7$

Tabela 3

Wykrywanie obecności *Campylobacter spp.* w wymazach pobranych z tuszek drobiu w zależności od rodzaju pożywki płynnej – selektywnej i nieselektywnej.
Detection of *Campylobacter spp.* from swab samples taken from poultry carcasses using selective and non-selective liquid medium.

Rodzaj pożywki Medium	Liczba zbadanych wymazów No. of swabs examined	Liczba/odsetek próbek dodatnich [%] Number/percentage of positive samples [%]
Bulion Boltona Bolton broth	17	17/100
Bulion Prestona Preston broth	17	16/94
Bulion Brucella Brucella broth	17	8/47

Uzyskane w obu układach modelowych dane wskazują, że pomimo braku statystycznie istotnych różnic pożywka agarowa mCCDA cechuje się stosunkowo najwyższą czułością i selektywnością w badaniach ilościowych oraz jakościowych mięsa drobiowego w kierunku *Campylobacter spp.* Ponadto trzeba podkreślić, iż znajduje to potwierdzenie w badaniach wykonanych przez innych autorów [1, 9, 10].

Wyniki badań porównawczych płynnych pożywek selektywno-namnażających i namnażających w zakresie wykrywania termotolerancyjnych *Campylobacter spp.*

w wymazach z drobiu przedstawiono w tab. 3. Najwyższy odsetek próbek dodatnich uzyskano w posiewach badanego materiału do bulionu selektywno-namnażającego wg Boltona (100%), nieznacznie niższy, bo wynoszący 94% wskaźnik osiągnięto w przypadku pożywki wg Prestona. Jednakże zdaniem niektórych autorów [5] bulion Prestona umożliwia osiągnięcie wyższej wykrywalności niż pożywka Park-Sandersa i stąd może być rekomendowana do stosowania w wykrywaniu tego patogena w mięsie drobiowym. W przypadku nieselektywnego bulionu *Brucella* osiągnięto wynik najniższy, wynoszący 47%.

Wnioski

1. Uzyskane wyniki badań dowodzą, że selektywno-namnażającą pożywką z wyboru w wykrywaniu *Campylobacter spp.* w środowisku mięsa drobiowego może być pożywka wg Boltona.
2. Spośród pożywek stałych najlepszymi parametrami wykazał się agar mCCDA, co potwierdza jego skuteczność w wykrywaniu oraz oznaczaniu ilościowym *Campylobacter spp.* przy jednoczesnym niewielkim wzroście mikroflory towarzyszącej.

Literatura

- [1] Barbosa P.A., Gonzalez R.G., Nava E.P., Nachamkin I.: Comparison of two selective media for the Isolation of *Campylobacter species* from a Pediatric Population in Mexico. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1999, **34**, 329-332.
- [2] Boston F.: Methods for isolation of Campylobacters from humans, animals, food and water. In Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts. "The increasing incidence of human Campylobacteriosis. Copenhagen, Denmark, November 2000, pp. 21-25.
- [3] Corry J.E.L., Post D.E., Colin P., Laisney M.J.: Culture media for the isolation of *Campylobacters*. *Int. J. Food Microbiol.*, 1995, **26**, 43-76.
- [4] Frost J.A., Gillespie I.A., O'Brien S.J.: Combining typing data and epidemiological information in *Campylobacter* surveillance – new opportunities. In Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts. "The increasing incidence of human Campylobacteriosis. Copenhagen, Denmark, November 2000, pp. 21-25.
- [5] Josefsen M.H., Lübeck P.S., Aalbaek B., Hoorfar J.: Preston and Park - Sanders protocols adapted for semi-quantitative isolation of thermotolerant *Campylobacter* from chicken rinse. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, **80**, 177-183.
- [6] Kwiatek K., Hoszowski A.: Kontrola jakości pożywek mikrobiologicznych w laboratorium akredytowanym. Wyd. Państwowy Instytut Weterynarii, Puławy 2002.
- [7] Kwiatek K., Wojtoń B., Stern N.J.: Metody i testy stosowane do izolowania i identyfikacji drobnoustrojów rodzaju *Campylobacter* z żywności. Wyd. Instytut Weterynarii, Puławy 1988.
- [8] PN-ISO 10272: 2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania termotolerancyjnych bakterii z rodzaju *Campylobacter*.
- [9] Whyte P., Mc Gill K., Cowley D., Carroll C., Doolan I., O'Leary A., Casey E., Collins J.D.: A comparison of two culture media for the recovery of thermophilic *Campylobacters* in broiler farm samples. *J. Microbiol. Methods.*, 2003, **54**, 367-371.

- [10] Zanetti F., Varoli O., Stampi S., De Luca G.: Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. Int. J. Food Microbiol., 1996, **33**, 315-321.

EVALUATION OF MEDIUM USED FOR DETECTION AND ENUMERATION OF *CAMPYLOBACTER SPP.* IN POULTRY MEAT

S u m m a r y

Two selective enrichment broths (Preston, Bolton) and one enrichment broth (Brucella) as well as modified charcoal cefoperazone deoxycholate (mCCDA) and Karmali agars were evaluated for their efficiency to isolate and enumerate *Campylobacter* spp. in samples taken from poultry carcasses. Swab samples for qualitative studies was taken from poultry carcasses and rubbed thoroughly over the surface of mCCDA and Karmali agar. Whereas, buffered peptone water rinses were used in order to estimate of the quantitative contamination of samples.

The study was carried out in three stages which includes solid and broth medium assessment for qualitative methods and solid medium assessment for quantitative methods according to the internal procedures and the Polish Standard PN-ISO 10272:2002. It has been showed that Bolton broth produced the best results but was statistically similar to Preston media (100% and 94%, respectively). However, in case of non-selective Brucella bullion, much lower level was gained (47%). Additionally, it has been also found that with using mCCDA agar detection was 100% while for Karmali agar 94%. Furthermore, mCCDA medium gave higher amount of *Campylobacter* spp. from washed carcass samples in comparison with Karmali agar. Lower percentage of positive samples was likely caused by increasing grow of nonspecific microflora (35% and 23% for Karmali and mCCDA agar, respectively). It should be point out that the best results were obtained by using Bolton selective enrichment broth and mCCDA selective agar.

Key words: *Campylobacter*, mCCDA agar, Karmali agar, Preston broth, Bolton broth, poultry meat ☒