

УДК: 619:636.4]:616.33/.35-022:579.835.12

ИЗОЛАЦИЈА НА ТЕРМОТОЛЕРАНТНИ КАМПИЛОБАКТЕРИ И *C. hyointestinalis* ОД РЕКТАЛНИ БРИСЕВИ КАЈ ЗДРАВИ СВИЊИ

Мреношки, С.¹, Маркиќ, З.¹, Проданов, Р.², Секуловски, П.³

¹Каџедрa за микробиологија и имунологија, Факултет за ветеринарна медицина - Скопје

²Каџедрa за исхрана, Факултет за ветеринарна медицина - Скопје

³Каџедрa за безбедносѝ на храна, Факултет за ветеринарна медицина - Скопје
E-mail: mrenoski@fvm.ukim.edu.mk

АБСТРАКТ

Термотолерантните кампилобактери се најчестите бактериски причинители на хуманиот инфективен гастроентерит во целиот свет. Притоа, најчесто изолирани видови се *Campylobacter jejuni* и *C. coli*, додека во помал процент и *C. upsaliensis* и *C. lari*. Како предизвикувач на хуман ентерит посочен е и *C. hyointestinalis*, кој не припаѓа на оваа група кампилобактери. Природен резервоар за наведените кампилобактери е интестиналниот тракт на голем број цицачи и птици, вклучувајќи ги тука и домашните животни. Кај нив овие бактерии најчесто се наоѓаат како коменсали а нивниот фецес претставува примарен извор за контаминација на надворешната средина. За разлика од фецесот кај луѓето, кој вообичаено се испитува при појава на пролив, термотолерантните кампилобактери и *C. hyointestinalis* во фецесот на животните најчесто се присутни во многу помала количина поради што и изолацијата може да биде неуспешна.

Целта на ова истражување беше да се процени валидноста на применетата процедура за изолација (и идентификација) на термотолерантните кампилобактери и *C. hyointestinalis* од ректални брисеви од свињи, како процедура за детектирање на кличносителство кај здрави животни.

Клучни зборови: Термотолерантни кампилобактери, *Campylobacter hyointestinalis*, изолација, идентификација.

ВОВЕД

Кампилобактерите го колонизираат гастроинтестиналниот тракт на голем број домашни и диви животни, вклучувајќи ги тука и оние кои се одгледуваат за човечка исхрана, што игра централна улога во пренесувањето на овие микроорганизми кај луѓето [1, 2]. Како главен резервоар на ин-

фекција за луѓето со хуманите ентеропатогени кампилобактери се наведува животната, но во повеќе студии е посочено дека и гастроинтестиналниот тракт на останатите животни е колонизиран со овие микроорганизми.

Свињите со кампилобактери се колонизираат веднаш после раѓањето [3, 4] и остануваат колонизирани во текот на целиот свој живот [5]. Тие од најрана возраст

го излачуваат кампилобактер во својата околина [3], а фармите на кои се одгледуваат претставуваат извор за инфекција на другите животни, како и околната средина и луѓето.

Постојат стандардни процедури пропишани од Меѓународната организација за стандарди (ISO) кои се однесуваат на детекција на термотолерантните кампилобактери во храна и сточна храна [6, 7], како и вода (ISO/CD 17995:2002), но ниту една од нив не е оптимална за изолација на кампилобактерите од живи животни [8]. Освен ISO, препораки за изолација и идентификација на кампилобактерите се дадени и од страна на официјалните тела на поедини држави [9, 10]. Сепак, најкомплетната процедура која може да се употреби во дијагностиката на мострите од ветеринарно потекло, дадена е од страна на Светската организација за здравјето на животните (OIE) во својот *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* [8].

Денес постојат повеќе подлоги кои се користат за изолација на термотолерантните кампилобактери и поголемиот дел од нив се комерцијално достапни [8, 10]. Примери за селективни бујони кои служат за збогатување се *Preston*, *Exeter*, *Bolton*, *Campylobacter enrichment broth (CEB)*, *CCDB (charcoal cefoperazone deoxycholate broth)* и *Park and Sanders* бујонот, а примери за селективни агари на кои се врши изолација се *Skirrow*, *Campy-Cefex*, *Preston*, *Butzler* и *Exeter* агар (кои содржат крв) и модифициран *Charcoal Cefoperazone Deoxycholate* агар (*mCCDA*) и *Karmali* агарот (кои содржат charcoal).

Кога се користат селективните подлоги, може да се употребат две различни процедури на инокулација, што зависи од типот на мострата [8, 10]. Директно засадување на агар се аплицира кога се испитуваат

мостри на кои не им треба збогатување, како што се фекалните и интестиналите одн. цекални мостри од живината или фецесот од луѓе со клиничка слика на инфекција. Примарно збогатување во течна подлога и последователно субкултивирање на агар се препорачува кога кампилобактерите се подложени на делувањето на стресните факторите од надворешната средина (на пример кога мострата е фекален брис) или кога се работи за ниско ниво на микроорганизми во фецесот (што е случај и со фецесот од говедата, овците и свињите) [8, 11].

За оптимален раст на кампилобактерите е неопходна микроаерофилна атмосфера која содржи 5-10% O₂ и 5-10% CO₂ [12, 13]. Оваа концентрација на гасови може да се обезбеди на повеќе начини но како наједноставен е со инкубирање на подлогите во лонци заедно со комерцијално достапни кесички специјално наменети за изолација на овие бактерии (гас генератор китови - *Anaerocult C [Merck]*, *Gas Generating Kit for Campylobacter [Oxoid]*). Микроаерофилната атмосфера е неопходна само кога се инкубира инокулираниот агар, што не е случај и кога се врши збогатување. При збогатување, бујоните се разливаат во епрувети или боци со затвораи, во количина која обезбедува просторот помеѓу површината на бујонот и затвараиот да биде помал од 2 cm [8].

Инокулираните подлоги можат да се инкубираат на две температури - 37°C или 42°C [8]. Втората се користи почесто, како би се минимизирал растот на контаминантите и селектирал оптималниот раст на *C. jejuni* и *C. coli*. Но со инкубација на 37°C може да се подобри растот на другите кампилобактери (*C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. fetus* и *C. hyointestinalis*) [8].

Бујоните за збогатување се инкубираат

24 до 48 часа и пресадуваат на селективниот агар. И тој се инкубира како и бујонот, бидејќи за 24 до 48 часа на температура од 42 °C, вообичаено растат двата најчесто изолирани кампилобактери - *C. jejuni* и *C. coli* [8].

Идентификацијата на изолатите се спроведува на две нивоа - прво се врши идентификација на родот (*genus*), односно се потврдува дека изолатите се припадници на родот *Campylobacter*, за потоа да се одреди видот (*species*) на кои тие му припаѓаат. Најшироко прифатен приод за идентификација (конфирмација и диференцирање) на кампилобактерите е базиран на класичните фенотипски карактеристики, кои ги опфаќаат податоците добиени од карактеристиките за растот и морфологијата на колониите, клеточните карактеристики и биохемиските тестови [7, 8, 10, 14], вклучувајќи ја тука и осетливоста/резистенцијата на одредени антимикробни супстанции.

ЦЕЛ

Целта на ова истражување беше да се процени валидноста на применетата процедура за изолација (и идентификација) на термотолерантните кампилобактери и *C. hyointestinalis* од ректални брисеви од свињи, како процедура за детектирање на кличноносителство кај здравите животни со мала количина на кампилобактери во својот дигестивен тракт.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Мостри во истражувањето беа ректални брисеви земени од 236 животни, со потекло од 4 свињарски фарми на терито-

ријата на Република Македонија. Мострите се земаа од 3 различни *производни фази* (прасилиште, одгледувалиште и тов), при што беа опфатени 4 *производни каџе-џории* на животни (мајки, прасиња во прасилиште, прасиња во одгледувалиште и товни свињи. За земање на мострите, беа користени стерилни, поединечно пакувани пластични брисеви кои веднаш после земањето се транспортираа до бактериолошката лабораторија при Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје, каде се засадуваа истиот ден (3-4 часа од земањето).

За изолација и добивањето на чисти култури се користеа три подлоги: *Preston* бујон (*Oxoid*), Кампилобактер селективен агар без крв (модифициран *Charcoal Cefoperazone*, *Deoxycholate* агар [*mCCDA*] - *Preston*, *Oxoid*) и *Columbia* крвен агар (*Oxoid*). Брисевите, со скратени дршки по асептична постапка, се ставаа во епруветките со *Preston* бујон. Истите се затвараа со гумени затварачи кои се фиксираа со леплива трака и инкубираа во аеробни услови, на температура од 42°C, во траење од 24 часа. После селективното збогатување, секој бујон се субкултивираше со разредување на посебна плоча *mCCDA*, со цел да се добијат поединични колонии на термотолерантни кампилобактери. Плочите се инкубираа во пластични садови (*BBL Gas Pak, Anaerobic Systems*), во кои микроаерофилната атмосфера (8-10% O₂ и 5-7% CO₂) се создаваше со *Anaerocult C (Merck)*. Инкубацијата на плочите беше на температура од 37°C, во времетраење од 48 часа. По добивањето на примарните култури, од секоја плоча каде беа присутни колонии карактеристични по својот изглед за термотолерантните кампилобактери, се одбираа најмалку една а најповеќе три колонии (соеви), кои потоа се субкултивираа со

разредување на крвен агар за да се добијат во чисти култури. Крвниот агар потоа се засадуваше под исти услови како и плочите со *mCCDA* кај примарната изолација.

Со добиените чисти култури, се изведуваа трите т.н. позитивни тестови за родот *Campylobacter*: Грам-препарат, влажен препарат и оксидаза тест (*Bactident oxidase*, Merck). Соевите кои беа позитивни на сите три теста (Грам-негативни спирални или извиткани стапчиња, со карактеристична подвижност во вид на сврдел и позитивна продукција на оксидаза), беа прогласувани за припадници на родот *Campylobacter* и беа идентифицирани до ниво на вид.

Со секој од идентификуваните соеви на ниво на род, се извршуваа следните тестови за идентификација на видот:

(1) толеранција на температура (засадување на крвен агар и инкубација во микроаерофилни услови на 3 различни температури: 25, 37 и 42°C);

(2) Раст во нормална атмосфера (засадување на крвен агар и инкубација во микроаерофилни услови на температура од 37°C);

(3) тест за хидролиза на хипурати (тестот се изведуваше по процедурата препорачана од *OIE* [233]);

(4) индоксил ацетат тест (се изведуваше со комерцијално произведени индоксил стрипови [*Indoxyl Strips*, Fluka, Sigma-Aldrich]);

(5) испитување осетливост/резистентност на цефалотин (*KF30*) и налидиксична киселина (*NA30*); зоните на инхибиција кои се користеа за интерпретација на резултатите изразени во mm беа за цефалотинот $R \leq 14$ и $S \geq 18$ одн. за налидиксичната киселина $R \leq 13$ и $S \geq 19$ (R =резистентно, S =осетливо а вредностите помеѓу двете наведени беа забележувани како I =интермедијарни);

(6) продукција на H_2S во *TSI* агар и каталаза тест.

Идентификацијата на припадноста на видот, беше вршена според совпаѓањето на детектираните фенотипски карактеристики на изолатот, со податоците дадени во Табелата 1.

РЕЗУЛТАТИ

Од вкупно 236 земени и испитани мостри, *Campylobacter spp.* беше изолиран од 222, или процентуално од 94% животни.

Кај позитивните животни, беа идентификувани трите термотолерантни кампилобактери за кои како носител се посочува свињата - *C. coli*, *C. jejuni* и *C. lari*. Освен нив, изолиран е и уште еден вид на кампилобактер предизвикувач на хумани ентерити - *C. hyointestinalis*, кој не спаѓа во претходно наведената група.

При диференцирање на видот кампилобактер, на налидиксичната киселина беа резистентни 85,1% од изолатите на *C. coli* и 78,6% од изолатите на *C. jejuni*. Осетливост на цефалотин, од термотолерантните кампилобактери искажаа само 4% од изолатите на *C. coli*. Од вкупниот број на изолирани соеви *C. hyointestinalis*, на цефалотин беа резистентни 18,2%.

ДИСКУСИЈА

Кај живи животни, истражувањата на *Campylobacter spp.* можат да се вршат со земање на мостри како што е фецес или ректални брисеви. Исправното земање на фецесот во фармски услови знае да биде последено со потешкотии, со оглед на условите на фармите и вознемиреноста на животните при земањето на мострите.

Табела 1. Фенотипски карактеристики на кампилобактерите кои можат да бидат изолирани од свињи, а според кои е вршена идентификација на видот на изолираните соеви.

Вид на кампилобактер	Ко- лонии	Биохемиски тестови				Раст на крвен агар во различни инкубациони услови					Осетливост на антибиотици	
	Големина на колонии (во mm)	Каталаза	Индоксил ацетат	Хидролиза на хипурати	H ₂ S во TSI	25°C, микроаерофилни услови	37°C, микроаерофилни услови	37°C, нормална атмосфера	37°C, анаеробни услови	42°C, микроаерофилни услови	Цефалотин	Наликисна киселина
<i>C. mucosalis</i>	1,5	-	-	-	+^c	-	+	N.D.	+	+	S	R^m
<i>C. sporum biovar sporum</i>	1-2	-	-	-	+^c	-	+	N.D.	+	+	S	R^m
<i>C. coli</i>	1-2	+	+	-	(-)^b	-	+	-	-	+	R	S
<i>C. jejuni subsp. jejuni</i>	1-2	+	+	+	-	-	+	-	-	+	R	S
<i>C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis</i>	Многу ситни до 1,5	+	-	-	(+)^b	(+)	+	-	-	+	V,S^f	R
<i>C. hyointestinalis subsp. lawsonii</i>		+	-	-	(+)^c	-	+	N.D.	+	+	S	R
<i>C. lanienae</i>	0,5	+	-	-	-	-	+	N.D.	+^f	+	R	R
<i>C. lari</i>	1-1,5	+	-	-	-	-	+	-	-	+	R	S^f

+, 95-100% соеви позитивни; **(+)**, 60-93% соеви позитивни; **(-)**, 14-50% соеви позитивни; **-**, 0-11% соеви позитивни; ^b, количини во трагови; ^c, во обилна количина; **+^f**, резултатите се слабо позитивни; **S**, 89-100% соеви осетливи; **S^f**, повеќето соеви (50-86%) осетливи; **R**, 95-100% соеви резистентни; **R^m**, 60-93% соеви резистентни; **N.D.**, без податоци.

Освен тоа, постојат податоци за детекција на *C. jejuni* од животински моистри [15] каде изолацијата од ректални брисеви била неуспешна од мострите на фецес. Со оглед на наведеното, ректалните брисеви (клоакални кај живината) се наметнуваат како поедноставно и задоволително решение кога треба да се вршат истражувања на живи животни. Тие се и препорачани како мостра и од OIE одн. WHO [8, 11] а користени се и во повеќе истражувања вршени кај свињите [2, 4, 16, 17, 18].

Поради изразената осетливост на влијанието на факторите на надворешната средина, се препорачува транспортот на мострите до лабораторијата да биде во транспортен медиум и соодветни услови (заштитени од делување на кислород и сончева светлина, и на температура од 0 до 20°C) [8]. Како уште еден фактор кој е посочен за успешна изолација, е и краткиот временски интервал од земањето на мострите до засадувањето, кој во студијата на Weijtens и сор. [19] изнесувал 3 часа и кој

довел до подобри резултати компарирани со други студии каде мострите биле пратени по пошта [2]. Во ова истражување, од сите наведени услови не беше исполнет само еден, кој се смета како најважен, а тоа е транспортот на брисевите да биде во транспортен медиум. Но затоа, времето од земањето на првиот брис на фрама па до засадувањето на последниот во лабораторија, изнесуваше 3 до 4 сати што зависеше од оддалеченоста на фармата од лабораторијата.

Од двете процедури на инокулација (со директно засадување на агар или со збогатување во течна подлога и последователно субкултивирање на агар), во ова истражување е користена втората, иако постојат наоди во корист на првата процедура кога се работи за изолација на кампилобактери од долните делови на гастроинтестиналниот тракт кај свињите [20]. Главна причина за тоа е што во препораките на OIE [36], WHO [10] и упатството за лабораториите кои изолираат кампилобактери во Нов Зеланд [8], збогатувањето се препорачува кога кампилобактерите се подложени на делувањето на стресните факторите од надворешната средина (на пр. кога мострата е фекален брис) или кога се работи за ветеринарни мостри, со ниско ниво на микоорганизми во фецесот (што е случај и со фецесот од свињите).

Како што е претходно наведено постојат повеќе различни подлоги, било течни било цврсти, кои можат да се користат во изолацијата на кампилобактери. Не постои некое правило кои од овие подлоги, ниту која комбинација, да се користи кога се изолираат термотолерантните кампилобактери за кои и се дизајнирани поголемиот дел од нив. Изборот на *Preston* бујон и *mCCDA* агарот во оваа студија, беше од две причини. Првата е дека и двете подлоги

одвоено се користени во повеќе истражувања со свињи [2, 4, 17] или други животни и луѓе [21, 22, 23, 24], а токму оваа комбинација ја користеа и *Van Looveren* и *Aarestrup* [25, 26] во своите студии со мостри од свињи. Втората причина е што во некои компаративни испитувања [27, 28] на повеќе агари кои се користат за изолација на кампилобактерите (*cefoperazone-amphotericin-teicoplanin* [CAT] агар, *Skirrow's* агар, *Butzler* агар), *mCCDA* дал подобри резултати одн. поголем процент на изолација. Добриот избор на подлоги за оваа студија, покрај високиот процент на изолација, го потврди и фактот што тие покажаа добра селективност, со оглед на тоа што од вкупно засадените 236 мостри само на 25 плочи (10.6%) беа детектирани контаминенти.

Инкубационите услови (температура, атмосфера и време), кои беа користени во оваа студија, беа во однос на препораките на произведувачот на подлогите (*Oxoid*). Иако може да се користи и микроаерофилна атмосфера за инкубација на бујоните [2], со нивна правилна припрема (оставање на празен простор од 1 до 2 cm над површината на бујонот) може да се избегне користењето на гас-генератор китовите [8] и со тоа непотребните трошоци за набавка на истите. За разлика од бујоните, во сите референци каде е вршена изолација на кампилобактери на агар, користена е микроаерофилна атмосфера која најчесто е создавана од комерцијално достапни гас-генератор китови, специјално дизајнирани за овие микоорганизми. Еден од селекционите услови за изолација на термотолерантните кампилобактери (покрај употребата на селективните подлоги) е и користењето на температурата од 42 °C во инкубацијата на подлогите, користена во голем број на студии [2, 21, 24, 25]. Во оваа студија беа следени упатствата кои ги дава

производителот (*Oxoid*), а кои се разликуваа од претходнио наведеното во однос на инкубационата температура кај *mCCDA*. Имено, производителот препорачува плочите со *mCCDA* да се инкубираат на 37°C, што и е практикувано во некои студии [17, 23], а со образложение дека на тој начин се подобрува процентот на изолација. Бидејќи во ова истражување не е вршена компарација на двете инкубациони температури, не може ниту да се потврди ниту да се негира ова тврдење. Само може да се шпекулира дека температурата од 37°C дава задоволителни резултати, со оглед на високиот процент на изолација кој е добиен во студијава. Исто така, мислење на авторот на оваа студија е дека користењето на температурата од 37°C има друга предност, а тоа е подобрување на изолацијата на кампилобактерите кои не спаѓаат во групата на термотолерантни (во овој случај тоа е *C. hyointestinalis*, кој искажува подобар раст на 37°C отколку на 42°C).

Идентификацијата на кампилобактерите, како и кај сите бактерии, започнува уште при примарната изолација одн. врз основа на изгледот на колониите. Описот на изгледот на колонии кај термотолерантните кампилобактери, кој треба да помогне во препознавањето на овие микроорганизми на *mCCDA*, е даден во повеќе референци [8, 10, 29, 30, 31], при што некаде е опишан и поединечен изглед на колониите на *C. coli*, *C. jejuni* и *C. lari*. Запазувањето на авторот на оваа студија е дека изгледот на колониите може да упати само на припадност на групата на термотолерантни кампилобактери, но не и на поединечниот вид. Тоа произлегува од фактот што при примарната изолација на *mCCDA*, беа забележани различни морфолошки карактеристики на колониите кај поголемиот број на изолати, дури и

кога тие припаѓале на ист вид. Поради ваквото варирање во колонијалниот изглед, следени беа препораките за симултано пресадување на сите колонијални типови присутни на плочите со примарна изолација [31], од што и произлезе да се субкултивираат по 1, 2 или 3 колонии од една плоча *mCCDA* на крвен агар поради добивање на чисти култури. И тука ситуацијата беше иста, одн. врз основа на изгледот на колониите не можеше да се претпостави за кој термотолерантен кампилобактер се работи.

За разлика од термотолерантните кампилобактери, колониите на *C. hyointestinalis* имаа јасно изразен, поспор раст на *mCCDA* и нивните ситни колонии (помали од 1 mm), лесно можеа да се селектираат од плочите каде беа присутни. Ваков поспор раст беше забележан и на крвниот агар. Изолацијата на *C. hyointestinalis*, всушност беше и едно од изненадувањата во ова истражување, со оглед на фактот што присуството на цефопразонот во примарната подлога може да го инхибира растот на овој вид кампилобактер со негова неуспешна изолација на *mCCDA* [23]. Спротивно на претходните литературни податоци, истражувањата на *Nielsen* и сор. [2] и *Haeninen* и сор. [32], исто како и ова истражување покажаа дека *mCCDA* го поддржува растот на *C. hyointestinalis*.

Идентификацијата на припадноста на родот, во почетокот беше вршена со трите конфирмациски теста пропишани со *ISO* стандардот [6] и применувани во некои студии [24, 33]. Со напредување на истражувањето и здобивањето на искуство кај авторот, од трите теста се исфрли Грам-препаратот, со оглед на тоа дека е доволно да се направи влажен препарат со кој се гледаат и морфологијата и начинот на движење на бактеријата, кои се многу

поважни во идентификацијата на кампилобактерите отколку Грам-реакцијата [31, 34]. Ваквиот начин на конфирмација е практикуван и од други автори [2, 21, 22, 25].

За идентификација на видот, предвидени се многу тестови кои можат да се користат за таа намена. Најчесто користени фенотипски карактеристики, пропишани од ISO стандардот [6] и аплицирани во голем број на истражувања [2, 17, 21, 22, 24, 25, 33, 35] беа и оние користени во оваа студија (види Табела 1). Кога се добија резултатите од овие тестирања кај сите изолати, при одредувањето на видот се применуваше следниот систем. Најпрво се исфрлија од предвид кампилобактерите за кои свињите не се домаќини, така да како можни кампилобактери изолирани во оваа студија останаа 7 видови - *C. coli*, *C. hyointestinalis* (со двата подвида *C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis* и *C. hyointestinalis subsp. lawsonii*), *C. jejuni*, *C. lanienae*, *C. lari*, *C. mucosalis* и биоварот *C. sputorum* b.v. *sputorum* од видот *C. sputorum*. И кај овие видови беше применет системот на елиминација. Бидејќи сите обработени изолати беа каталаза-позитивни, веднаш од предвид беа исфрлени *C. mucosalis* и биоварот *C. sputorum* b.v. *sputorum* кои се каталаза-негативни. Сите изолати кои беа позитивни со тестот за хидролиза на индоксил ацетат, беа сметани како *C. coli* или *C. jejuni*, а ваквите изолати беа понатаму класифицирани во соодветниот вид во зависност од тестот за хидролиза на хипурати - *C. coli* е негативен, а најголемиот дел од изолатите на *C. jejuni* се позитивни. Индоксил ацетат негативните соеви, кои беа јасно позитивни на продукција на H_2S во TSI беа прогласувани како *C. hyointestinalis*, за на крај да остане дилемата дали индоксил ацетат и H_2S во TSI негативните соеви се *C. lanie-*

nae или *C. lari*. Како што може да се види од Табелата 1, резултатите од најголемиот дел од тестови се исти и за двата вида со исклучок на растот на 37°C во анаеробни услови, каде повеќето соеви на *C. lanienae* се позитивни а *C. lari* е негативен. Бидејќи во студијата кај овие изолати немаше раст во вакви услови, а и колониите беа со големина од 1-2 mm после 48 часа инкубација (колониите кај *C. lanienae* се со големина од 0,5 mm после инкубација од 72 часа), овие изолати беа прогласувани како *C. lari*.

Од целата, претходно спомнатата анализа за идентификацијата на видот кампилобактер, се гледа дека осетливоста/резистенцијата спрема налидиксична киселина и цефалотин не беа стриктно вклучени во идентификационата процедура во оваа студија (иако се тие наведени во литературата како тестови за идентификација). Зголемената резистенција на кинолоните и детектирањето на соеви резистентни на налидиксична киселина кај *C. coli* и *C. jejuni* [36, 37, 38, 39, 40, 41], доведуваат до давање на препораки од некои автори [42, 43] дека осетливоста на оваа антимикробна супстанца не треба повеќе да се користи како критериум за лабораториска идентификација, особено кај термотолерантните кампилобактери. Во прилог на оваа препорака се и резултатите добиени од оваа студија, каде на налидиксичната киселина беа резистентни висок процент на изолати од *C. coli* и *C. jejuni*, што беше главната причина зошто налидиксичната киселина не се користеше во идентификацијата на видот на кампилобактер. Што се однесува до цефалотинот, тој сеуште се препорачува за користење во оваа намена, но и кај него постојат исклучоци од правилото дека *C. coli* и *C. jejuni* се резистентни а *C. hyointestinalis* осетлив. Осетливи соеви на *C. coli*, *C.*

jejuni и *C. lari* се детектирани во истражувања со изолати од говеда, живина, отпадни води и луѓе [39, 44, 45, 46, 47]. И во оваа студија, мал дел од изолатите на *C. coli* покажаа осетливост на оваа антимикуробна супстанца додека тоа не беше детектирано кај изолатите на другите два термотолерантни кампилобактери. Иако *C. hyointestinalis* генерално се смета за осетлив на цефалотин, во неколку референци оваа карактеристика се смета како варијабилна [48, 49] одн. се реферира дека повеќето соеви се осетливи [50, 51]. И резултатите од во оваа студија се совпаднаа со овие податоци, бидејќи поголемиот дел од изолатите на *C. hyointestinalis* беа осетливи на цефалотин, но сепак варијабилноста се потврди со наодот на 4 резистентни изолати на ниво на сите фарми. Тие ја дадоа вредноста од 18,2% резистентност од вкупниот број на изолирани соеви *C. hyointestinalis*, што се совпадна со процентот изнесен во ревијалниот преглед на идентификационите методи за кампилобактери и др. бактерии на *On* [50], каде како цефалотин-резистентни се посочуваат 18% од изолатите на овој вид. Поради опишаната варијабилност кај цефалотинот, како би се избегнала интерференција во презентирањето на резултатите, и тој не беше стриктно користен како идентификационен параметар во ова истражување.

ЗАКЛУЧОЦИ

1. Ректалните брисеви се сосема задоволителна мостра за изолација на кампилобактери кај свињи.

2. Доколку брисевите се засадат во кус временски интервал од нивното земање, нема потреба од користење на транспортен медиум.

3. Процедурата на изолација со збогатување, при што се користат *Preston* бујотот, *mCCDA* агарот и температура на примарна изолација од 37°C, е соодветна за изолација на термотолерантните кампилобактери присутни кај свињите како и *C. hyointestinalis*.

4. Од трите препорачани конфирмациски тестови, влажниот препарат и оксидаза тестот се доволни за да се потврди припадноста на изолатот кон родот *Campylobacter*.

5. Начинот за диференцирање на видот кампилобактер корисен во ова истражување, дава задоволителни резултати во секојдневната рутинска лабораториска дијагноза и при отсуство на посоефицицирана метода (пр. *PCR*).

6. Додека резистенцијата/осетливоста према цефалотин може сеуште да се применува во диференцирањето на видот кампилобактер, резистенцијата/осетливоста према налидиксичната киселина не треба повеќе да се користи во таа намена.

ISOLATION OF THERMOTOLERANT CAMPYLOBACTERS AND *C. hyointestinalis* FROM RECTAL SWABS OF HEALTHY PIGS

Mrenoski, S.¹, Markic, Z.¹, Prodanov, R.², Sekulovski, P.³

¹ *Department of microbiology and immunology, Faculty of Veterinary Medicine Skopje*

² *Department of animal nutrition, Faculty of Veterinary Medicine Skopje*

³ *Department of food safety, Faculty of Veterinary Medicine Skopje*

E-mail: mrenoski@fvm.ukim.edu.mk

SUMMARY

Thermotolerant campylobacters are the most common bacterial etiological agents of human infectious gastroenteritis worldwide. The most frequent isolated species among them are *Campylobacter jejuni* and *C. coli*, and less frequent *C. upsaliensis* and *C. lari*. Also *C. hyointestinalis*, that not belong to the group of thermotolerant campylobacters, has been indicate as an agent of human infectious gastroenteritis. Natural reservoir of all named campylobacters is the intestinal tract of many mammals and birds, including domestic animals. In these animals, campylobacters are commonly present as commensals and their feces is considered as a prime source for environmental contamination. Unlike the human feces which is usually examined in the cases of diarrhea, thermotolerant campylobacters and *C. hyointestinalis* in the animal feces are generally present in a much lesser amount and the isolation very often could be unsuccessful.

The aim of this study was to estimate the validity of applied procedure for isolation (and identification) of thermotolerant campylobacters and *C. hyointestinalis* from pig rectal swabs, as a procedure for detection of healthy animal carriers.

Keywords: thermotolerant campylobacters, *Campylobacter hyointestinalis*, isolation, identification

ЛИТЕРАТУРА

- Gorkiewicz, G., Feierl, G., Zechner, R., Zechner and E.L. (2002). Transmission of *Campylobacter hyointestinalis* from a Pig to a Human. *Journal Of Clinical Microbiology*, Vol. 40, No. 7, p. 2601–2605.
- Nielsen, E.M., Engberg J. and Madsen, M. (1997). Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 19 (1997) 47-56
- Harvey, R.B., Young, C.R., Ziprin, R.L., Hume, M.E., Genovese, K.J., Anderson, R.C., Droleskey, R.E., Stanker, L.H. and Nisbet, D.J. (1999). (1999). Prevalence of *Campylobacter* spp isolated from the intestinal tract of pigs raised in an integrated swine production system., 215(11):1601-4.
- Weijtens, M.J.B.M., van der Plas, J., Bijker, P.G.H., Urlings, H.A.P., Koster, D., van Logtestijn, J.G. and Huis in't Veld, J.H.J. (1997). The transmission of *Campylobacter* in piggeries; an epidemiological study. *Journal of Applied Microbiology*; 83, 693-698.
- Alter, T., Gaull, F., Kasimir, S., Gürtler, M., Mielke, H., Linnebur, M. and Fehlhaber, K. (2005). Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms. *Veterinary Microbiology*, Volume 108, Issues 3-4, Pages 251-261
- ISO International Standard 10272 (1995)+Technical Corrigendum 1 and 2 (1997). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter*. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Valremb , Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland
- ISO/CD 10272-1 and 10272-2 (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* growing at 41,5 degrees Celsius. Part 1: Detection method; Part 2: Colony count technique. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembe, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2004). Ch. 2.10.8. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.
- FDA BAM (1998). FDA Bacteriological Analytical Manual. Chapter 7, *Campylobacter*, Hunt, J.M., Abeyta, C. and Tran, T. 8th edition (revision A), 23 pages.
- Donnison, A. (2003). Isolation of Thermotolerant *Campylobacter* – Review & Methods for New Zealand Laboratories.
- Bolton, F.(E.). (2000). Methods for isolation of *Campylobacter* from humans, animals, food and water. In: WHO, Department of Communicable Disease Surveillance and Response. The Increasing Incidence of Human *Campylo-*

- bacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts, Copenhagen, Denmark, 2000.
12. Corry, J.E.L., Post, D.E., Colin, P. and Laisney M.J. (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. *Int. J. Food Microbiol.*, 26, 43–76.
 13. Vandamme, P. (2000). Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: *Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 3–26.
 14. Vandamme, P.A.R. (2000). Methods for identification of *Campylobacter*. In: WHO, Department of Communicable Disease Surveillance and Response. The Increasing Incidence of Human Campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts, Copenhagen, Denmark, 2000.
 15. Kaplan, R.L., Goodman, L.J., Barrell, J.E., Trenholme, G.M. and Landau, W. (1982). Comparison of Rectal Swabs and Stool Cultures in Detecting *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Journal of clinical microbiology*, vol.15, No. 5, p. 959–960.
 16. Botteldoorn, N., Heyndrickx, M., Rijpens, N. and Herman, L. (2001). The prevalence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *VTEC* in pig farms. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork. 2–5 Sept. 2001, Leipzig, Germany
 17. Steinhäuserová, I., Fojtíková, K. and Matiasovic, J. (2001). Subtyping of *Campylobacter* spp. Strains and their incidence in piglets. *Acta Vet. Brno*, 70: 197–201
 18. Steinhäuserová, I., Fojtíková, K., Matiašovic, J. (2001). The occurrence and typing of *Campylobacter coli* strains in pigs. *Folia Veterinaria*, Vol. 45, No. 3.
 19. Weijtens, M.J.B.M., Bijker, P.G.H., Van Der Plas, J., Urlings, H.A.P. and Biesheuvel, M.H. (1993). Prevalence of *Campylobacter* in pigs during fattening; an epidemiological study. *Vet. Q.* 15:138–43.
 20. Madden, R.H., Moran, L. and Scates, P. (2000). Optimising recovery of *campylobacter* spp. from the lower porcine gastrointestinal tract. *J Microbiol Methods*, 42(2):115–9.
 21. Hald, B. and Madsen, M. (1997). Healthy Puppies and Kittens as Carriers of *Campylobacter* spp., with Special Reference to *Campylobacter upsaliensis*. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 35, No. 12, p. 3351–3352
 22. Keramas, G., Bang, D.D., Lund, M., Madsen, M., Bunkemborg, H., Telleman, P. and Christensen, C.B.V. (2004). Use of Culture, PCR Analysis, and DNA Microarrays for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Chicken Feces. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 42, No. 9, p. 3985–3991.
 23. Kulkarni, S.P., Lever, S., Logan, J.M.J., Lawson, A.J., Stanley, J. and Shafi M.S. (2002). Detection of *campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. *J Clin Pathol* 55:749–753.
 24. Petersen, L., Nielsen, E.M., Engberg, J., On, S.L.W. and Dietz, H.H. (2001). Comparison of Genotypes and Serotypes of *Campylobacter jejuni* Isolated from Danish Wild Mammals and Birds and from Broiler Flocks and Humans. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 67, No. 7, p.3115–3121
 25. Aarestrup, F.M., Nielsen, E.M., Madsen, M. and Engberg, J. (1997). Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2244–2250.
 26. Van Looveren, M., Daube, G., De Zutter, L., Dumont, J.M., Lammens, C., Wijdooghe, M., Vandamme, P., Jouret, M., Cornelis, M. and Goossens, H. (2001). Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 48:235–240.
 27. Engberg, J., On, S.L.W., Harrington, C.S. and Gerner-Schmidt, P. (2000). Prevalence of *Campylobacter*, *Arco-bacter*, *Helicobacter*, and *Sutarella* spp. in human fecal samples as estimated by reevaluation of isolation methods for *campylobacters*. *J. Clin. Microbiol.* 38:286–291.
 28. Ono, K., Masaki, H. and Tokumaru, Y. (1995). Isolation of *campylobacter* spp. From slaughtered cattle and swine on blood-free selective medium. *J Vet Med Sci.*, 57(6):1085–7.
 29. Health Protection Agency, UK (2003). National Standard Method: Identification of *campylobacter* species. Issue no: 1 Issue date: 01.12.2003 Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Page 1 of 10, Reference no: BSOP ID 23i1
 30. Health Protection Agency, UK (2003). Standard Operating Procedure: Detection of *Campylobacter* Species, Issue no: 1.3 Issue date: 02.06.03 Issued by Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory on behalf of the Group F, W & E Co-ordinators Forum and the Environmental Surveillance Unit, CDSC. Page 1 of 10, Reference no: F 21i1.3
 31. USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 3rd Edition (1998). Chapter 6. Isolation, Identification, and Enumeration of *Campylobacter jejuni/coli* from Meat and Poultry Products (Authors: Ransom, G.M. and Rose, B.E.)
 32. Haenninen, M.-L., Sarelli, L., Sukura, A., On, S.L.W., Harrington, C.S., Matero, P. and Hirvelae-Koski, V. (2002). *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, a common *Campylobacter* species in reindeer. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 717–723
 33. Sails, A.D., Bolton, F.J., Fox, A.J., Wareing, D.R.A. and Greenway, D.L.A. (2002). Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Environmental Waters by PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 68, No. 3, p. 1319–1324
 34. Government of Canada, Compendium of Analytical Methods Volume 3. Isolation of thermophilic *campylobacter* from food. http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume3/mflp46_e.html
 35. Sasaki, Y., Fujisawa, T., Ogikubo, K., Ohzono, T., Ishihara, K. and Takahashi, T. (2003). Characterization of *Campylobacter lanienae* from pig feces. *J Vet Med Sci.* Jan;65(1):129–31.
 36. Altwegg, M., Burnens, A., Zollinger-Iten, J. and Penner, J. L. (1987). Problems in Identification of *Campylobacter jejuni* Associated with Acquisition of Resistance to Nalidixic Acid. *Journal Of Clinical Microbiology*, 25(9): 1807–1808.
 37. Lior, H. (1984). New, extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and „*Campylobacter laridis*.“ *J. Clin. Microbiol.* 20:636–640.
 38. Megraud, F., Chevrier, D., Desplaces, N., Sedallian, A. and Guesdon, J.L. (1988). Urease-positive thermophilic *Campylobacter* (*Campylobacter laridis* variant) isolated

- from an appendix and from human feces. *J. Clin. Microbiol.* 26:1050-1051.
39. Morris, G.K., El Sherbeeney, M.R., Patton, C.M., Kodaka, H. Lombard, G.L., Edmonds, P., Hollis, D.G. and Brenner, D.J. (1985). Comparison of Four Hippurate Hydrolysis Methods for Identification of Thermophilic *Campylobacter* spp. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 22, No. 5, p.714-718.
 40. Ursing, J., Walder, M. and Sandstedt, K. (1983). Base composition and sequence homology of deoxyribonucleic acid of thermotolerant *Campylobacter* from human and animal sources. *Curr. Microbiol.* 8:307-310.
 41. Walder, M., Sandstedt, K. and Ursing, J. (1983). Phenotypic characteristics of thermotolerant *Campylobacter* from human and animal sources. *Curr. Microbiol.* 9:291-296.
 42. Gaudreau, C. and Gilbert, H. (1997). Comparison of disc diffusion and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39, 707-712
 43. Pedersen, K. and Wedderkopp, A. (2003). Resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish broilers at farm level. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 111-119.
 44. Brooks, B.W., Garcia, M.M., Fraser, D.E., Lior, H., Stewart, R.B. and Lammerding, A.M. (1986). Isolation and characterization of cephalothin-susceptible *Campylobacter coli* from slaughter cattle. *J Clin Microbiol.* 24(4):591-595.
 45. Holler, C. (1988). Quantitative and qualitative studies of *Campylobacter* in a sewage treatment plant. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hyg [B]* 185(4-5):326-39.
 46. Ng, L. K., Taylor, D. E. and Stiles, M. E. (1988). Characterization of freshly isolated *Campylobacter coli* strains and suitability of selective media for their growth. *J. Clin. Microbiol.* 26:518-523.
 47. Yildirim, M., Istanbuluoglu, E. and Ayvali, B. (2005). Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Thermophilic *Campylobacter* Species in Broiler Chickens. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 655-660
 48. Edmonds, P., Patton, C. M., Griffin, P. M., Barrett, T. J., Schmid, G. P., Baker, C. N., Lambert, M. A. and Brenner, D. J. (1987). *Campylobacter hyointestinalis* associated with human gastrointestinal disease in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 25:685-691.
 49. Snelling, W.J., Matsuda, M., Moore, J.E. and Dooley, J.S.G. (2006). Under the microscope: *Arcobacter* (review). *Letters in Applied Microbiology* 42 (2006) 7-14
 50. On, S.L.W. (1996). Identification Methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and Related Organisms. *Clinical Microbiology Reviews*, July, p.405-422.
 51. On, S.L.W., Bloch, B., Holmes, B., Hoste, B. and Vandamme, P. (1995). *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., Isolated from the Porcine Stomach, and an Emended Description of *Campylobacter hyointestinalis*. *International journal of systematic bacteriology*, Vol. 45, No. 4, p.767-774.