

Izolacija *Yersinia enterocolitica* iz sirovog mleka* (Isolation of *Yersinia Enterocolitica* from Raw Milk)

Dr. Stojanka MITIĆ, mr. Anka KASALICA, dr. Ivanka OTENHAJMER,
Veterinarski i mlekarski institut, Beograd

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper

UDK:579.842.1/2

Prispjelo: 7. 12. 1988.

Sažetak

U radu su korišćeni različiti postupci izolacije enteropatogenih bakterija vrsta *Yersinia enterocolitica*. Tehnikom preobogaćenja i obogaćenja materijala dokazana je kontaminacija mleka s *Y. enterocolitica* u 31,5% uzoraka mleka.

Detekcija *Y. enterocolitica* bila je u zavisnosti od sezonskih varijacija uzorkovanja s maksimumom u martu i aprilu, a minimumom u oktobru mesecu (1,8%).

Identifikacija izolovanih suspektnih sojeva vršena je savremenim postupkom API 10 E sistemom (Accurate Precise Identification).

Summary

Various isolation methods of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* were used in the study presented in this paper. By the preenrichment and enrichment procedures of the material, contamination of milk with *Y. enterocolitica* was demonstrated in 31,5% of samples.

Detection of *Y. enterocolitica* was carried out in the dependance of seasonal variations of samples with maximal values in March and minimal in October (1,8%).

Identification of isolatèd, suspicious strains was performed by a modern API 10 E system (Accurate Precise Identification).

Uvod

Yersinia enterocolitica je jedna od retkih patogenih bakterija koja se razmnožava na niskim temperaturama (0° do 5°C). Prvu identifikaciju *Y. enterocolitica* primenio je Frederiksen (1964). Ona je ranije nosila naziv *Bacterium enterocoliticum*, *Pasteurella pseudotuberculosis type b* i *Pasteurella x*. U kratkom vremenu identifikovana je kao uzročnik akutnog gastroenteritisa, mezenteričnog limfadenitisa, septikemije, meningitisa, infekcije kože i očiju i dr. Izolovana je iz velikog broja namirnica (Black, 1978; Hanna i sar. 1976; Stern, 1981.) i može da se na 4°C razmnožava do velikih populacija (Stern, 1980.). Mollaret (1976) ističe kao mogućnost izvora tih bakterija zemljište i vodu.

* Saopšteno na XXIX Naučnom sastanku mikrobiologa, epidemiologa i infektologa Jugoslavije (1987)

Prva izolacija *Y. enterocolitica* datira od 1972 (Sarrouy), a od 1975. počinju sistematska izučavanja u raznim zemljama: Čehoslovačkoj (Aldova i sar. 1975.), Kanadi (Schiemann i Toma, 1978.), Australiji (Hughes i Jensen, 1981.), Francuskoj (Vidon i Delmas, 1981) i Danskoj (Cristensen, 1982.). Naročito su zapažena istraživanja Delmasa i Vidona (1982.) i njihove konstatacije da je u proseku 54,5% uzoraka sirovog mleka bilo kontaminirano s *Y. enterocolitica*, da bi u zimskim mesecima kontaminacija iznosila 77,2%.

Nekoliko podataka iz naše literature takođe ukazuje na aktualnost izolacije *Y. enterocolitica* iz životnih namirnica. Tratnik i sar. (1984.) su je izolovali iz uzoraka francuske salate i tatarskog bifteka, a pri tom su oba uzorka odgovarala uslovima koje propisuje Pravilnik o minimalnim uslovima u pogledu bakteriološke ispravnosti kojima moraju odgovarati namirnice u prometu. Pecić i sar. (1984.) iznose slučajeve enterokolitisa izazvan s *Y. enterocolitica* na području Vojvodine. Pojava oboljenja je tumačena kao posledica konzumiranja svinjskog mesa. Pecić i sar. (1985.) ispitivali su utjecaj niskih temperatura (4 °C i -18 °C) na preživljavanje *Y. enterocolitica* u nekim vrstama namirnica. Utvrdili su da te bakterije na -18 °C preživljavaju 26 dana, s tim što u oba slučaja broj bakterija počinje da opada posle 21-og dana.

Obzirom da je poslednjih godina *Y. enterocolitica* izolovana iz kliničkog materijala, bilo je od interesa da se ispita njezina osjetljivost prema vrstama *Lactobacillus* (Mitić i sar., 1985.). Rezultati ispitivanja pokazali su visoki stepen osjetljivosti obih patogenih sojeva prema određenim vrstama *Lactobacillus*.

Kao što se vidi, razni su autori otkrili prisustvo *Y. enterocolitica* u mleku, a kod nas, prema našem saznanju, nije izučavana, te su stoga izvršena ispitivanja stepena i obima kontaminacije sirovog mleka s *Y. enterocolitica*. Planirana istraživanja vršena su u cilju realne procene da li *Y. enterocolitica* zbog naročitih osobina potencijalnog patogeniteta treba uvrstiti u Pravilnik o mikrobiološkim uslovima u pogledu bakteriološke ispravnosti životnih namirnica.

Materijal i metod rada

U vremenskom periodu od 6. 10. do 9. 11. 1986. godine uzorkovano je 106 uzoraka mleka, a u zimskom periodu 10. 2. 1987. uzorkovano je 15 uzoraka. Krajem zime i ranog proleća (15. 3. — 9. 4. 1987) uzorkovano je 76 uzoraka mleka. Uzorkovanje mleka vršeno je na sabirnim mestima i na rampi sledećih mlekara: Lajkovac, Loznica, Niš, Zaječar, Kragujevac, Pančevo i Zemun.

Za izolaciju *Y. enterocolitica* iz mleka u prvom delu rada korišćen je puferni rastvor s 1% sorbitolom i 0,15% žučnih soli (PBSSB). Inkubacija zasejanog materijala u podlozi za obogaćenje trajala je 21 dan na 4 °C. Posle inkubacije iz podloge za obogaćenje materijal je ezom nanošen na Mac-Conkey agar s antibioticima novobiocinom i cefsulodinom. Izolovane gram-negativne bakterije biohemijski su identifikovane prema produkciji ureaze i triptofandezaminaze, fermentaciji laktoze i salicina i prema pokretljivosti. Na taj je način biohemijski provereno 90 sojeva gram-negativnih štapićastih bakterija.

Za drugi deo istraživačkog rada za izolaciju *Y. enterocolitica* korišćen je postupak po Delmasu (1982.), preobogaćenja, obogaćenja, izolacije i identifikacije. Tamponizirana peptonska voda s dvostrukom koncentracijom služila je za preobogaćenje (EPT), a podloga s azidom i ampicilinom (PSTA) za obogaćenje. Uzorak mleka od 125 ml prenet je u 125 ml EPT. Inkubacija te smeše je izdvojena na 4 °C u trajanju od 4 nedelje. Zatim je od te smeše uzimano po 1 ml i preneto u 20 ml PSTA i materijal je inbukiran na 28 °C za 48 sati. Iz te podloge ezom je prenet materijal na Mac-Conkey agar s Tween 80. Karakteristične kolonije su izolovane na hranljivi agar i individualno su ispitivane. Posle porasta na Kligleru, stvaranja ureaze i triptofandezaminaze, izvršena je prva selekcija gram-negativnih sojeva. Na taj način došlo je do reprezentativnih izolata, čija je kompletna identifikacija sprovedena pomoću API 10 E za Enterobacteriaceae i ispitivanja pokretljivosti na 28 °C i 37 °C.

Rezultati ispitivanja i diskusija

Rezultati izolacije *Y. enterocolitica* primenom dve različite tečne podloge za obogaćenje prikazani su tabelarno (tab. 1).

Tablica 1. Izolacija *Y. enterocolitica* iz sirovog mleka u raznim vremenskim intervalima

Table 1. *Y. Enterocolitica* Isolations from Raw Milk in Various Time Intervals

| Datum uzorkovanja Sampling Date | Broj analiziranih uzoraka mleka Tested Milk Samples Count | Metod PBSSB Method | Metod EPT + PSTA EPT + PSTA Method |
|------------------------------------|--|--------------------------|---|
| 6. 10 do 9. 11. 1986. | | | |
| From 6. 10. to 9. 11. 1986. | | | |
| I | 41 | | — |
| II | 19 | | — |
| III | 17 | | — |
| IV | 13 | | 1 |
| V | 16 | | 1 |
| | 106 | | 2 |
| 10. 2. 1987. | | | |
| I | 15 | | |
| 5. 3. do 9. 4. 1987. | | | |
| From 15. 3. to 9. 4. 87. | | | |
| II | 10 | | 2 |
| VI | 15 | | 6 |
| V | 9 | | 5 |
| VII | 12 | | 5 |
| VIII | 15 | | 3 |
| I | 15 | | 3 |
| | 76 | | 24 |

Kao što se može odmah zapaziti, samo 2 uzorka mleka bila su pozitivna na prisustvo *Y. enterocolitica* kada je uzorkovanje izvršeno u jesenjem periodu. Negativan nalaz konstatovan je u uzorcima mleka uzorkovanim 10. 2. 1987. godine.

Obzirom na duži zimski period, sledeća uzorkovanja mleka su izvršena krajem marta i početkom aprila, kada je kontaminacija s *Y. enterocolitica* dokazana u 31,5% uzoraka.

Iz jesenjih uzoraka mleka izolovano je 100 sojeva. Biohemijskom proverom oni su pripadali vrstama: *Alkaligenes faecalis*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Proteus* i *E. coli*. Ti rezultati jasno ukazuju da nema selektivnih hranljivih podloga, pa je veoma teško otkriti mali broj *Y. enterocolitica* među velikim brojem drugih mikroorganizama. Međutim, ako bismo prihvatili tumačenja Delmasa (1982) da je minimalna kontaminacija u jesen, onda bi dobijeni rezultati bili u saglasnosti s tom konstatacijom.

Iz uzoraka mleka drugog istraživačkog perioda izolovana su i identifikovana, prema API 10 E sistemu, 173 soja gram-negativnih štapićastih bakterija. Dominantna mikroflora identifikovanih sojeva pripadala je vrstama *Pseudomonas* i *Proteus* (tablica 2).

Ukupno je identifikovano 37 sojeva *Y. enterocolitica* koji su bili ureaza pozitivni, fermentirali su glukozu, nisu stvarali gas i H_2S , a bili su negativni na triptofan dezaminazu. Biohemijske osobine su rezimirane i tabelarno prikazane (tablica 3).

Poslednjih godina razni autori su signalizirali prisustvo *Y. enterocolitica* u mleku. U Kanadi, Schieman i Toma su našli te bakterije u 31% uzoraka, a 0,4% u pasterezovanom mleku. Cristensen je našao 10% uzoraka mleka kontaminirano s *Y. enterocolitica* kod proizvođača, a 16% na sabirnim mestima. Za vreme zime 1980—1981. bilo je 8,7% uzoraka mleka pariskog bazena kontaminirano s *Y. enterocolitica*.

Na osnovu naših ispitivanja smatramo da je dug preliminarni rad s poboljšanom tehnikom preobogaćenja i obogaćenja doprineo detekciji *Y. enterocolitica* u većem broju uzoraka sirovog mleka. Upotreba tečne podloge PSTA s $pH = 8,3$ verovatno je povoljna za razvoj tih bakterija. Mac-Conquey agar s Tween 80, s druge strane, omogućio je dobar porast raznih kolonija, kao i *Y. enterocolitica*.

Zaključak

Analizom eksperimentalnih podataka došlo se do određenih pokazatelja, na osnovu kojih bi se mogli izvesti sledeći zaključci:

— da je detekcija *Y. enterocolitica* u zavisnosti od sezonskih varijacija s maksimumom u martu i aprilu, a minimumom u oktobru;

— da je primenjenom tehnikom preobogaćenja i obogaćenja i izolacijom dokazana kontaminacija mleka s *Y. enterocolitica* u 31,5% uzoraka mleka uzorkovanih u martu i aprilu;

— da bi se što objektivnije procenjivala ta otkrivena problematika, istraživanja treba nastaviti korišćenjem sada već usavršenije tehnike izolacije i identifikacije *Y. enterocolitica*.

Tablica 2. Tipične biohemijske reakcije za Enterobacteriaceae (čitanje posle inkubacije od 18 časova na 37 °C, ali najkasnije do 24 časa)

Table 2. Typical Biochemical Reactions of Enterobacteriaceae (Reading performed after 18 hours of incubation at 37 °C, but no more than 24 hours)

| | ONPG | GLU | ARA | LDC | ODC | CIT | H ₂ S | URE | TDA | IND | OX |
|---|----------------|-----|-----|----------------|----------------|----------------|------------------|-----|-----|----------------|----|
| ENTEROBACTERIACEAE | | | | | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | + ¹ | + | + | d | d | — | — | — | — | + | — |
| <i>Shigella</i> | d | + | d | — | d | — | — | — | — | d | — |
| <i>Edwardsiella</i> | — | + | — | + | + | — | + | — | — | + | — |
| <i>Citrobacter diversus</i> (<i>Levinea</i>) | + | + | + | — | + | + | — | — | — | + | — |
| <i>Citrobacter</i> | + | + | + | — | — | + | + | — | — | — | — |
| <i>Arizona</i> | + | + | + | + | + | + | + | — | — | — | — |
| <i>Salmonella</i> | — | + | + | + ² | d | + ² | + ² | — | — | — | — |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | + | + | + | + | — | + | — | + | — | — ³ | — |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | + | + | + | + | + | + | — | — | — | — | — |
| <i>E. cloacae</i> | + | + | + | — | + ⁴ | + | — | — | — | — | — |
| <i>E. hafniae</i> | + | + | + | + | + | — | — | — | — | — | — |
| <i>E. liquefaciens</i> | + | + | + | + | + | + | — | — | — | — | — |
| <i>Serratia</i> | + | + | — | + | + | + | — | — | — | — | — |
| <i>Proteus vulgaris</i> | — | + | — | — | — | d | + | + | + | + | — |
| <i>P. mirabilis</i> | — | + | — | — | + | d | + | + | + | — | — |
| <i>P. morgani</i> | — | + | — | — | + | — | — | + | + | + | — |
| <i>P. rettgeri</i> | — | + | — | — | — | + | — | + | + | + | — |
| <i>Providencia</i> | — | + | — | — | — | + | — | — | + | + | — |

Presumptivna dijagnostika za gram-negativne organizme sličnih Enterobacteriaceae

Presumptive diagnosis for gram negative organisms which mimic Enterobacteriaceae

| | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>Pseudomonas</i> ⁵ | — | — | — | — | — | + | — | — | — | — | + |
| <i>Moraxella II (Herellea)</i> | — | — | + | — | — | ± | — | — | — | — | — |

— rezultat testa uglavnom negativan

+ rezultat testa uglavnom pozitivan

— test result generally negative

+ test result generally positive

± rezultat testa često pozitivan

d različiti biohemijski tipovi

± test result more often positive

d different biochemical types

Fusnota

¹ »E.coli je nepokretna i ne proizvodi gas« (Alkaescens-Dispar) su ONPG — ili ONPG+.

² *Salmonella paratyphi A* je LDS—, CIT—, H₂S+.

³ *Klebsiella pneumoniae, oxytoca* biotipe je IND+.

⁴ Sojevi slični *E.cloacae* izuzev što je ODC—, često nose naziv *Erwinia* ili *Enterobacter*.

⁵ *Pseudomonas aeruginosa, fluorescens* ili *putida*.

Footnotes

¹ »Non-motile, non-gas producing *E. coli*« (Alkaescens-Dispar) are ONPG— or ONPG+.

² *Salmonella paratyphi A* are LDS—, CIT—, H₂S+.

³ *Klebsiella pneumoniae, oxytoca* biotype are IND+.

⁴ Strains similar to *E. cloacae* except for ODC — are often called *Erwinia* or *Enterobacter agglomerans*.

⁵ *Pseudomonas aeruginosa, fluorescens* or *putida*.

Tablica 3. Glavne biokemijske karakteristike sojeva Y. enterocolitica izolovanih iz mleka zimskog perioda**Table 3. Principal Biochemical Properties of Y. enterocolitica Strains Isolated from Winter Milk**

| Biohemijske karakteristike Biochemical Properties | Test organizam Y. enterocolitica Y. enterocolitica Test Organism | Izolovani sojevi s Kliglera Isolated Strains from Kligler |
|--|---|---|
| Ureaza Urease | + | + |
| Triptofan dezaminaza (TDA) Tryptophan Desaminase | — | — |
| ONPG | + | + |
| Pokretljivost na 22 °C Motility at 22 °C | + | + |
| Pokretljivost na 37 °C Motility at 37 °C | — | — |
| Voges-Proskauer Voges-Proskauer | + | + |
| Citrat Citrate | +— | — |
| Indol Indole | + | + |
| Lizin dekarboksilaza (LDC) Lysin Decarboxilasis | — | — |
| Ornitin dekarboksilaza (ODC) Ornithine Decarboxilasis | + | + |
| Fermentacija laktoze Fermentation of Lactose | — | — |
| H ₂ S | — | — |
| Glukoza Glucose | + | + |

Literatura

- ALDOVA, E., CERNA, J., JANECKOVA, M. and PEGRIMKOVA, J. (1957): Yersinia enterocolitica and its demonstration in the food. *Cesk. Hyg.*, **8**, 395—404.
- BLACK, R. E., JACKSON, R. J., TSAI, T., MEDVESKY, M., SHAYEGANI, M., FEELEY, J. C., MAC LEOD, K. I. E. and WAKELEE, A. M. (1978): Epidemic Yersinia enterocolitica infection due to contaminated chocolate milk. *N. Eng. J. Med.*, **298**, 76—79.
- CHRISTENSEN, S. G.: The prevalence of Yersinia enterocolitica in slaughter animals, water and raw milk in Denmark. In Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity. Ed. ROBERTS, T. A., HOBBS, G. CRISTIAN, J. H. B. and SKOVGAARD, N., London, Academic Press, 1982.

- DELMAS, C.: Contribution à l'étude des souches de *Yersinia enterocolitica* isolées du lait. Thèse Doct. 3 cycle Pharm. Strasbourg, 1982.
- FREDERIKSEN, W. (1964): A study of some *Y. pseudotuberculosis* bacteria. **Scand. Congr. Pathol. Microb.** 14; 103—104.
- HUGHES, D. and JENSEN, N. (1981): *Yersinia enterocolitica* in raw goat's milk. **Appl. Environ. Microbiol.**, 41; 309—310.
- MITIĆ, S., OTENHAJMER, I. i VIČKOVIĆ-VIŠNJIĆ, L.: Uticaj antimikrobnih metabolita vrsta *Lactobacillus* na *Yersinia enterocolitica*. Zbornik radova V Kongresa mikrobiologa Jugoslavije, 103—134, 1985.
- MOLLARET, H. H. (1976): Contribution à l'étude épidémiologique des infections à *Yersinia enterocolitica*. III. Bilan provisoire des connaissances. **Méd. Mal. Infect.**, 6, 442—448.
- PEČIĆ, J., KULAUZOV, M., VUKOVIĆ, B., JATIĆ-STAJŠIĆ, M. i STEFANOVIĆ, S.: Prva izolacija *Yersinia enterocolitica* u SAP Vojvodini. XXVI Naučni sastanak mikrobiologa, epidemiologa i infektologa Jugoslavije, Pula, Zbornik radova, 80—81, 1984.
- PEČIĆ, J., MODOROVIĆ, M., STANOJEVIĆ, S. i MIHAJLOVIĆ, M.: Uticaj niskih temperatura na održavanje i razmnožavanje *Yersinia enterocolitica* u nekim vrstama namirnica. Zbornik radova V Kongresa mikrobiologa Jugoslavije, 132, 1985.
- SARROUY, J. (1972): Isolement d'une *Yersinia enterocolitica* à partir du lait. **Méd. Mal. Infect.**, 2, 67.
- SCHIEMANN, D. A. and TOMA, S. (1978): Isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw milk. **Appl. Environ. Microbiol.**, 35, 54—58.
- TRATNIK, M., PODLEKAR, F. i ZAJC-SATLER, J.: Izolacija *Yersinia enterocoliticae* iz živežnih namirnica, Zbornik radova, XXVI Naučni sastanak mikrobiologa, epidemiologa i infektologa, Pula, 312, 1984.
- VIDON, D. J. M. and DELMAS, C. L. (1981): Incidence of *Yersinia enterocolitica* in raw milk in eastern France. **Appl. Environ. Microbiol.**, 41, 355—359.