

Campylobacter jejuni/colilari –bakteerien osoittaminen ja tunnistaminen.

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

ISO 10272-1 DIS:2015

Rikastus Bolton-liemessä mikroaerobisesti 37°C/4 – 6 h, 41,5 °C/48 h mCCD-agar ja Preston-agar mikroaerobisesti 41,5 °C/48 h. Rikastus Preston-liemessä mikroaerobisesti 41,5 °C/24 h, mCCD-agar mikroaerobisesti 41,5 °C/48 h. Veriagar mikroaerobisesti 37 tai 41,5 °C /24 - 72 h, mikroskopiointi, varmistus MALDI-TOF -tutkimuksella tai vaihtoehtoisesti: katalaasi- ja oksidaasikoe, veriagar aerobisesti 25°C/44 h, hippuraatin hydrolyysi- ja indoksyliasettiin hydrolyysikoe.

Menetelmän kulku on esitetty Liitteessä 1.

Poikkeamat viitemenetelmästä:

- 1) Selektiiviagarmaljojen inkubointia voidaan jatkaa tarvittaessa 72 h:een.
- 2) Eristetyt puhtasviljelmät voidaan inkuboida $41,5 \pm 0,5$ °C:n sijasta 37 ± 1 °C:ssa /24 – 72 h.
- 3) Biokemiallisten varmistuskokeiden ja aerobisen kasvun tutkimisen sijaan voidaan käyttää MALDI-TOF –tutkimusta.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu lämpökestoisten campylobakteereiden, *C. jejuni*, *C. coli* ja *C. lari*, osoittamiseen elintarvikenäytteistä ja rehuista. Vastaava tutkija päättää tapauskohtaisesti käytetäänkö tutkimuksessa molempia rikastusliemiä vai vain jompaakumpaa niistä.

3 Määritelmä(t)

Lämpökestoiset campylobakteerit ovat gramnegatiivisia, mikroaerofiilisiä, oksidaasipositiivisia, katalaasipositiivisia, kaarevia tai spiraalinmuotoisia sauvoja, jotka voivat erityisesti vanhoissa viljelmissä esiintyä myös kokkoidimuotoisina. Campylobakteereilla on polaariset flagellat, joiden avulla ne liikkuvat tyypillisin pyörivin, nopein liikkein. Ne eivät muodosta itiöitä, eivät hajota hiilihydraatteja ja vaativat erityiselatusaineita kasvaakseen hyvin.

Campylobacter jejuni/coli/lari –bakteerien osoittaminen ja tunnistaminen.

4 Periaate

Kampylobakteerien osoittaminen vaatii yleensä rikastuksen valikoivassa nestemäisessä elatusaineessa. Rikastuksen jälkeen näyte viljellään kiinteälle, valikoivalle elatusaineelle. Tyypilliset pesäkkeet varmistetaan mikroskooppisesti ja biokemiallisesti.

Kampylobakteerit ovat herkkiä hapelle. Niitä tutkittaessa pitää työskennellä viivyttämättä. Näytettä tai agarviljelmiä ei saa jättää huoneenlämpöön pöydälle odottamaan (voivat kuolla jo 2 tunnissa). Näyte on kuljetettava laboratorioon jäädytettynä mahdollisimman nopeasti. Näytettä ei saa pakastaa, sillä kampylobakteerit kuolevat helposti - 20 °C:ssa.

5 Mahdolliset virhelähteet

Näytteen tai agarmaljoilla kasvavien kantojen säilyttäminen kosketuksissa ilman kanssa yli 2 h ajan voi tappaa kampylobakteerin.

Kampylobakteerit voivat tuhoutua näytteestä, jos näyte pakastetaan.

Jos rikastusliemiastian yläosaan jäävä ilmatila on liian suuri tai korkki ei ole tiivis, liian suuri happipitoisuus voi estää tai hidastaa kampylobakteerin kasvua.

Heikosti katalaasiposiitiviset kannat voidaan tulkita virheellisesti katalaasinegatiivisiksi.

Hippuraatin hydrolyysikokeessa liian pieni siirros voi antaa virhenegatiivisen tuloksen.

Hippuraatin hydrolyysikokeessa vaaleansininen väri voidaan tulkita virheellisesti positiiviseksi tulokseksi.

Hippuraatin hydrolyysikokeessa yli 10 minuutin inkubointi nihydriinin lisäämisen jälkeen voi antaa virhepositiivisen tuloksen

MALDI-TOF –tutkimuksessa liian lyhyt tai liian pitkä kasvatusaika sekä liian ohut tai liian paksu siirros näytelevyllä voivat huonontaa tunnistumista.

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratorioissa työskenneltäessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223.

7 Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) Lämpökaappi tai kampylobakteeri-inkubointikaappi $41,5 \pm 0,5$ °C, jonka kaasuseos sisältää CO₂ 10% ja O₂ 5%.
- 3) Lämpökaappi tai kampylobakteeri-inkubointikaappi 37 ± 1 °C, jonka kaasuseos sisältää CO₂ 10% ja O₂ 5%.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Campylobacter jejuni/coli/lari –bakteerien osoittaminen ja tunnistaminen.

- 4) Anaerobiastia ja Oxoidin Gas Generating Kit Campylobacter System - kaasunkehityspusseja tai vakuumpumppu ja mikroaerofiilikaasuseosta (10 % CO₂, 5 % O₂ ja 85 % N₂)
- 5) MALDI-TOF –tutkimus: ks. työohje LAB 7085.

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Bolton-liemi (KAMBO)
- 2) Preston-liemi
- 3) mCCD-agar (esim. Oxoid-valmismaljat)
- 4) Preston-agar
- 5) veriagar
- 6) brusellaliemi (BRULIE)
- 7) 0,1 % peptonisuolaliuos (PEPSU)
- 8) 1 % puskuroitu peptonivesi (BPW)
- 9) 1 % natriumhippuraattiliuos, à 0,4 ml
- 10) Ninhydriiniliuos (API-reagenssi)
- 11) Indoksyylisetaattikiekot (esim. Rosco)
- 12) Oksidaasireagenssi
- 13) Katalaasireagenssi, 3 % vetyperoksidi
- 14) MALDI-TOF –tutkimus: ks. työohje LAB 7085.

9 Kontrollikannat

Campylobacter jejuni EELA 446 (ATCC 33560, WDCM 00005)
Campylobacter coli EELA 502 (ATCC 33559, WDCM 00072)
Campylobacteri lari Evira 577 (eristetty EURL-vertailunäytteestä)

10 Näytteen esikäsittely

Suorita mahdollinen esikäsittely toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti.

11 Suoritus

11.1 Rikastusviljely

Anna rikastuslienten lämmetä huoneenlämpöiseksi ennen käyttöä.

Punnitse 25 g näytettä 225 ml:aan Bolton-lientä. Rikastusastiaan tai -pussiin saa jäädä ilmatilaa enintään ¼ tilavuudesta ja astia/pussi on suljettava tiiviisti. Inkuboi ensin 37 ± 1 °C / 4-6 h ja sitten 41,5 ± 0,5 °C / 44± 4h.

Punnitse 25 g näytettä 225 ml:aan Preston-lientä. Rikastusastiaan tai -pussiin saa jäädä ilmatilaa enintään ¼ tilavuudesta ja astia/pussi on suljettava tiiviisti. Inkuboi 41,5 ± 0,5 °C / 24±2 h. **Jos rikastusliemi inkuboidaan kamylobakteeri-inkubointikaapissa astiaa/pussia ei saa sulkea tiiviisti, jotta kaasut vaihtuvat.**

Mikäli tutkitaan kokonaista broileria tai broileripaloja, otetaan näytteeksi 25 ml hierontalientä. Sulatettua lintua tai 500 g broileripaloja hierotaan steriilissä Stomacher

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Campylobacter jejuni/colilari –bakteerien osoittaminen ja tunnistaminen.

3500 -pussissa 3 minuuttia 225 ml:ssa 1 % puskuroitua peptonivettä (BPW), jolloin jäljelle jäänyt liemi voidaan rikastaa salmonellan osoittamiseksi.

11.2 Viljely agarmaljoille

Siirrosta Bolton-liemestä silmukalla 10 µl hajotusviljelynä mCCD-agarille ja toisella silmukalla 10 µl Preston-agarille. Siirrosta Preston-liemestä silmukalla hajotusviljelynä 10 µl mCCD-agarille. Inkuboi $41,5 \pm 0,5$ °C / 44 ± 4 h mikroaerobisesti ja jatka inkubointia tarvittaessa 72 tuntiin saakka.

Viljele kontrollikannat aina rinnan näytteiden kanssa.

11.3 Maljojen lukeminen

Kampylobakteerit kasvavat mCCD-agarilla vaaleanharmaina, joskus metallinhohtoisina, litteähköinä pesäkkeinä ja Preston-agarilla harmahtavina litteinä pesäkkeinä. Pesäkkeet voivat levitä kostealla agarpinnalla peittäen koko maljan.

12 Varmistuskokeet

12.1 Pesäkkeiden viljely

Viljele tyypilliset pesäkkeet (5 pesäkettä) puhtaaksi veriagarille tai jollekin muulle ei-selektiiviselle agaralustalle, jolla campylobakteerit kasvavat. Inkuboi 37 ± 1 °C tai $41,5 \pm 0,5$ °C/20 - 72 h mikroaerobisesti. Käytä varmistuskokeiden positiivisena kontrollina *C. jejuni* EELA 446 –bakteerikantaa. Lisäksi hippuraatin hydrolyysikokeessa tulee negatiivisena kontrollina käyttää *C. coli* EELA 502 -bakteerikantaa.

Jos kyseessä on kiinteällä alustalla tunnistamista varten lähetetty puhdasviljelmä, pesäkkeet eivät aina lähde kasvamaan siirrostettuna suoraan veriagarille. Siirrosta tällöin bakteerikasvustoa kiinteältä alustalta brusellaliemeen ja inkuboi 37 ± 1 °C/20 - 24 h mikroaerobisesti. Siirrosta liemiviljelmästä hajotusviljelmänä mCCD-alustalle kuten kohdassa 11.2 ja jatka eteenpäin ohjeen mukaan.

Säilytä aina primaariviljelmät mikroaerobisesti 3 °C \pm 2 °C:ssa, kunnes tutkimus on valmis.

12.2 Mikroskooppinen tutkimus

Varmista bakteerikannan liikkuvuus mikroskopoimalla 0,1% peptonisuolaliuokseen tehtyä bakteerisuspensiota objektilasilla, peitinlasilla peitettynä, käyttäen vaihesiirtomikroskooppia (objektiivi 100x). Kampylobakteerit ovat kaarevia tai kierteisiä sauvoja, jotka liikkuvat tyypillisin nopein, pyörivin liikkein. Jos viljelmä ei ole tuore, osa soluista on kokkoideja.

12.3 Katalaasi- ja oksidaasikokeet

Tee katalaasi- ja oksidaasikokeet (työohjeet LAB 2054 ja LAB 2055). Kampylobakteerit ovat katalaasi- ja oksidaasipositiivisia. Molemmat reaktiot ovat campylobakteereilla yleensä heikkoja.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Campylobacter jejuni/coli/lari –bakteerien osoittaminen ja tunnistaminen.

12.4 Aerobinen kasvu

Viljele bakteerikanta veriagarille tai jollekin muulle ei-selektiiviselle agaralustalle, jolla campylobakteerit kasvavat. Inkuboi aerobisesti 25 °C/44± 4 h Voit jakaa maljat 4 – 6 osaan.

Kampylobakteerit eivät kasva aerobisesti.

12.5 Biokemiallinen tunnistus

C. jejuni, *C. coli* ja *C. lari* voidaan erottaa toisistaan hippuraatti-, nalidiksiinihappo- ja indoksyyliasetaattikokeilla:

Laji	Hippuraatin hydrolyysi	Indoksyyliasetaatin hydrolyysi
<i>C. jejuni</i>	+	+
<i>C. coli</i>	-	+
<i>C. lari</i>	-	-

S = herkkä

R=resistentti

12.5.1 Hippuraatin hydrolyysikoe

Sekoita 10 µl silmukallarunsaasti bakteerimassaa 0,4 ml:aan natriumhippuraattiliuosta, niin että liuos tulee selvästi sameaksi. Käytä positiivisena ja negatiivisena kontrollina *C. jejuni* EELA 446 - ja *C. coli* EELA 502 -bakteerikantoja. Inkuboi 37 ± 1 °C vesihauteessa 2 h ± 5 min tai lämpökaapissa 4 h ± 5 min. Liuosta ei tarvitse inkuboida mikroaerobisesti.

Lisää varovasti 1 – 2 tippaa ninhydiiniliuosta. Älä sekoita. **Lue tulos 2-3 min kuluttua** ja aina viimeistään 10 minuutin sisällä.

Positiiviseksi reaktioksi luetaan syvä tummansininen väri. **Vaaleansininen väri luetaan negatiiviseksi.** Jos tulos on negatiivinen, koe toistetaan

C. jejuni antaa positiivisen tuloksen ja *C. coli* negatiivisen.

12.5.2 Indoksyyliasetaatin hydrolyysi

Tee indoksyyliasetaatin hydrolyysikoe työohjeen LAB 7074 mukaan. Käytä positiivisena kontrollina *C. jejuni* EELA 446 - ja negatiivisena kontrollina *C. lari* Evira 577 –kanta.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Campylobacter jejuni/coli/lari –bakteerien osoittaminen ja tunnistaminen.

12.6 Varmistus MALDI-TOF –tutkimuksella

Morfologialtaan tyypillisten, liikkuvien bakteerien lajitunnistus voidaan tehdä biokemiallisten varmistustestien ja aerobisen kasvun tutkimisen sijaan MALDI-TOF – tutkimuksella työhöjeen LAB 7085 mukaan. Tutkimus tulee tehdä 24 h ja lisäksi tarvittaessa 48 h ikäisistä verimaljan puhdaskasvustoista käyttäen suoraa siirrostusta. Jos tunnistus epäonnistuu tai tunnusluku (score) <2,2, tutkimus uusitaan.

Luotettavana *C. jejuni*, *C. coli* tai *C. lari* –lajitunnistuksena pidetään tunnistusta, jonka tunnusluku ≥ 2.2 . Jos tutkittava kanta tunnistuu muuksi kuin *C. jejuni*, *C. coli* tai *C. lari* –lajin bakteeriksi tai jos tunnusluku <2,2, tulos on varmistettava biokemiallisesti.

13 Tulokset

13.1 Tulosten ilmoittaminen

Jos kamylobakteereita ei todeta, tulos ilmoitetaan: Kamylobakteereita ei todettu 10 g:ssa näytettä (tai tutkitussa määrässä). Jos kamylobakteereita todetaan, tulos ilmoitetaan: *C. jejuni*, *C. coli* tai *C. lari* todettiin 10 g:ssa näytettä (tai tutkitussa määrässä).

14 Menetelmän validointi

Menetelmä on validoitu kollaboratiivisesti. Käyttöönottovalidointi on tehty ja tulokset esitetty validointiraportissa.

MALDI-TOF –tutkimus on validoitu biokemiallisia varmistustestejä vastaan 14.5.2014. Menetelmän spesifisyys oli 100 %. Menetelmän sensitiivisyydeksi saatiin 99 % yhden näytteen tunnusluvun oltua <2,2. Kaikki validointiaineistoon sisältyneet EURL:n vertailunäytetutkimuksen 2014 kannat (18 *C. jejuni*, *C. coli* tai *C. lari* -kanta) tunnistuivat oikein tunnusluvuilla >2.2.

15 Menetelmän status

Standardimenetelmä	<input type="checkbox"/>
Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>
Virallinen menetelmä	<input type="checkbox"/>
Referenssimenetelmä	<input type="checkbox"/>
Sisäinen menetelmä	<input type="checkbox"/>

16 Laadunvarmistusmenetelmät

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input checked="" type="checkbox"/>
Menetelmävertailut	<input checked="" type="checkbox"/>
Vertailu/kontrollikantojen käyttö	<input checked="" type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet	<input type="checkbox"/>
Rinnakkaismääritykset	<input type="checkbox"/>
Valvontakortit	<input checked="" type="checkbox"/>

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Campylobacter jejuni/colilari –bakteerien osoittaminen ja tunnistaminen.

17 Viitteet

Bessède, E. Solecki, O., Sifré, E., Labadi, L., ja Mégraud F. 2011. Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 17: 1735–1739.

ISO 10272-1 DIS:2015. Microbiology of food and animal feed — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* — Part 1: Detection method

18 Muutokset edelliseen versioon

20.9.2016

Viitemenetelmä vaihdettu ja ohje päivitetty viitemenetelmän mukaiseksi:

- lisätty Bolton-liemen esi-inkubointi 37°C/4 – 6 h ja inkubointiaika 41,5 °C:ssa muutettu 48 h:ksi
- lisätty rikastus Preston-liemessä mikroaerobisesti 41,5 °C/24 h
- lisätty viljely Bolton-liemestä Preston-agarille
- lisätty viljely Preston-liemestä mCCD-agarille
- muutettu aerobisen kasvun lämpötila 25°C/44 h
- nalidiksiinihappoherkkyysskoe poistettu

Laatija: Marjaana Hakkinen