

***Campylobacter jejuni/colilari*- bakteerien osoittaminen siipikarjan umpisuolinäytteistä.**

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

ISO 10272-1:2017

(Näytteiden yhdistäminen peptoni-saliiniin, mCCD-agar mikroaerobisesti 41,5 °C/48 h, veriagar mikroaerobisesti 37 °C tai 41,5 °C/24 – 48 h, mikroskopointi, katalaasi- ja oksidaasikoe, veriagar aerobisesti 37 °C/24 – 48 h, hippuraatin hydrolyysi ja indoksyliasettaattikoe, vaihtoehtoisesti varmistus MALDI-TOF -tutkimuksella)

- 1) Tulokset voidaan lukea mCCD-agarilta 24 h:n inkuboinnin jälkeen ja inkubointia jatketaan tarvittaessa.
- 2) Pesäkkeitä varmistetaan viiden sijasta kolme.
- 3) Eristetyt puhtasviljelmät voidaan inkuboida 41,5 ± 0,5°C:n sijasta 37±1 °C:ssa /24 – 48 h.
- 4) Biokemiallisten varmistuskokeiden ja aerobisen kasvun tutkimisen sijaan voidaan käyttää MALDI-TOF –tutkimusta.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu lämpökestoisten kampylobakteereiden, *C. jejuni*, *C. coli* ja *C. lari*, osoittamiseen siipikarjan uloste- ja umpisuolinäytteistä.

3 Määritelmä(t)

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

4 Periaate

Kampylobakteerien osoittamiseksi umpisuolensisällöstä näyte viljellään ilman rikastusta kiinteälle, valikoivalle elatusaineelle. Tyypilliset pesäkkeet varmistetaan mikroskooppisesti ja biokemiallisesti.

***Campylobacter jejuni/coli/lari*- bakteerien osoittaminen siipikarjan umpisuolinäytteistä.**

Kampylobakteerit ovat herkkiä ilman hapelle ja kuivumiselle. Niitä tutkittaessa pitää työskennellä viivyttämättä. Näytettä tai agarviljelmiä ei saa jättää huoneenlämpöön pöydälle odottamaan (voivat tuhoutua 2 h:ssa). 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 ilmaan yli 2 h ajan voi tappaa kampylobakteerin.

Kampylobakteerit voivat tuhoutua näytteestä, jos näyte pakastetaan.

Heikosti katalaasiposiitiiviset kannat voidaan tulkita virheellisesti katalaasinegatiivisiksi.

Hippuraatin hydrolyysikokeessa liian pieni siirros voi antaa virhenegatiivisen tuloksen.

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

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskenneltäessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223.

7 Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) Steriilejä pumpulitikkuja
- 3) Lämpökaappi tai kampylobakteeri-inkubointikaappi $41,5 \pm 0,5$ °C
- 4) Lämpökaappi tai kampylobakteeri-inkubointikaappi 37 ± 1 °C
- 5) Oxoidin Gas Generating Kit Campylobacter System –kaasunkehityspusseja ja anaerobiastia tai vakuumpumppu ja mikroaerofiilikaasuseosta (10 % CO₂, 5 % O₂ ja 85 % N₂)
- 6) Mikroskooppi, jossa vaihesiirto-optiikka
- 7) McFarland-vertailuputki 2
- 8) MALDI-TOF –tutkimus: ks. työohje LAB 7085

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) 0,1% peptoni-suolaliuos (laimennosvesi)
- 2) mCCD-agar (esim. LabM)
- 3) Brusellanaudanveriagar
- 4) Ninhydriiniliuos (API-reagenssi)
- 5) Indoksyliasetaatikiekot (esim. Rosco)
- 6) Oksidaasireagenssi
- 7) Katalaasireagenssi, 3 % vetyperoksidi
- 8) MALDI-TOF –tutkimus: ks. työohje LAB 7085

9 Kontrollikannat

- 1) *Campylobacter jejuni* EELA 446 (ATCC 33560)
- 2) *Campylobacter coli* EELA 502 (ATCC 33559)
- 3) *Campylobacter lari* Evira 577 (eristetty EURL-vertailunäytteestä)

10 Näytteen esikäsittely

Suorita mahdollinen esikäsittely toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti.

11 Suoritus

11.1 Näytteiden käsittely ja yhdistäminen

Avaa umpisuoli steriilien pinsettien ja veitsen tai saksien avulla. Yhdistettävät näytteet (enintään 10 näytettä) voidaan avata samoilla työvälineillä.

Umpisuolinäytteiden yhdistämistä varten ota steriilillä pumpulitikulla näyte umpisuolen sisällöstä pyöräyttämällä tikkua niin, että siihen tarttuu mahdollisimman paljon suolensisältöä. Pane tikku koeputkeen, jossa on 5 ml steriiliä laimennosvettä. Samaan putkeen voi yhdistää kymmenen tikkua.

Näytteitä voidaan säilyttää yhdistettynä laimennusliuoksessa jääkaapissa enintään 3 vrk.

11.2 Viljely

Sekoita koeputkisekoittajalla putkea, johon tupponäytteet on yhdistetty, ja tee liemestä 10 µl silmukalla hajotusviljely mCCD-agarille.

Inkuboi $41,5 \pm 0,5$ °C / 24 - 48 h mikroaerobisesti ja jatka inkubointia tarvittaessa 72 tuntiin saakka.

Viljele kontrollikannat aina rinnan näytteiden kanssa.

11.3 Maljojen lukeminen

Kampylobakteerit kasvavat vaaleanharmaina, joskus metallinhohtoisina, litteähköinä pesäkkeinä, jotka voivat levitä kostealla agarpinnalla peittäen koko maljan.

12 Varmistuskokeet

12.1 Pesäkkeiden viljely

Viljele tyypilliset pesäkkeet (3 pesäkettä) puhtaaksi veriagarille tai jollekin muulle ei-selektiiviselle agaralustalle, jolla kampylobakteerit kasvavat. Inkuboi 37 ± 1 °C tai $41,5 \pm$

***Campylobacter jejuni/coli/lari*- bakteerien osoittaminen siipikarjan umpisuolinäytteistä.**

0,5 °C/20 - 48 h mikroaerobisesti. Viljele varmistuskokeiden positiiviseksi kontrolliksi *C. jejuni* EELA 446 -bakteerikanta ja hippuraatin hydrolyysikoetta varten negatiiviseksi kontrolliksi *C. coli* EELA 502 -bakteerikanta.

12.2 Mikroskooppinen tutkimus

Varmista bakteerikannan liikkuvuus mikroskopoimalla 0,1% peptonisuolaveden tehtyä bakteerisuspensiota objektilasilla, peitinlasilla peitettynä, käyttäen vaihesiirtomikroskooppia (objektiivi 100x). *Campylobacter*-bakteerit 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). *Campylobacter*-bakteerit ovat katalaasi- ja oksidaasiposiitivisia. Molemmat reaktiot ovat *Campylobacter*-bakteereilla yleensä heikkoja.

12.4 Aerobinen kasvu

Viljele bakteerikanta veriagarille tai jollekin muulle ei-selektiiviselle agaralustalle, jolla *Campylobacter*-bakteerit kasvavat. Inkuboi aerobisesti 37 ± 1 °C/18 - 24 h tai tilanteen niin vaatiessa pidempään. Voit jakaa maljat 4 – 6 osaan.

Campylobacter-bakteerit 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>	-	-

12.6 Hippuraatin hydrolyysikoe

Sekoita silmukalla runsaasti 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 tai lämpökaapissa 4 h.

***Campylobacter jejuni/coli/lari*- bakteerien osoittaminen siipikarjan umpisuolinäytteistä.**

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.

12.7 Indoksyliasetaatien hydrolyysi

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

12.8 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 verilevyn 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 25 g:ssa näytettä (tai tutkitussa määrässä). Jos kamylobakteereita todetaan, tulos ilmoitetaan: *C. jejuni*, *C. coli* tai *C. lari* todettiin 25 g:ssa näytettä (tai tutkitussa määrässä).

14 Menetelmän validointi

Menetelmä on validoitu käyttäen siirrostettua broilerin suolensisältöä. Yhdistetyistä näytteistä 27 /27 todettiin menetelmällä *C. jejuni* –positiiviseksi heti siirrostuksen jälkeen, 24/24 kahden ja 12/12 kolmen vuorokauden jääkaappisäilytyksen jälkeen, kun yhteen kymmenestä yhdistetystä näytteestä lisättiin *C. jejunia* $2,4 \times 10^5$ – $1,8 \times 10^7$ pmy/g.

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.

Campylobacter jejuni/coli/lari- bakteerien osoittaminen siipikarjan umpisuolinäytteistä.

15 Menetelmän status

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

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 10272-1:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* growing at 41,5°C - Part 1: Detection method

18 Muutokset edelliseen versioon

8.8.2017. Viitemenetelmä päivitetty. Biokemiallisista kokeista poistettu nalidiksiinihappoherkkyyden testaus. Laatija: Marjaana Hakkinen.

Siirryttäessä IMS toimintajärjestelmään, versiointi aloitettu alusta (v1). Tekninen päivitys