

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

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

NMKL 119:2007, muunnos.

(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, nalidiksiinihappoherkkyys ja tarvittaessa indoksyyliasetaattikoe, vaihtoehtoisesti varmistus MALDI-TOF -tutkimuksella)

- 1) Menetelmässä ei käytetä rikastusta.
- 2) Kiinteänä valikoivana elatusaineena käytetään ainoastaan mCCD-agaria.
- 3) Tulokset voidaan lukea mCCD-agarilta 24 h:n inkuboinnin jälkeen ja inkubointia jatketaan tarvittaessa.
- 4) Pesäkkeitä varmistetaan viiden sijasta kolme.
- 5) Eristetyt puhtasviljelmät voidaan inkuboida 41,5 ± 0,5 °C:n sijasta 37±1 °C:ssa /24 – 48 h.
- 6) Varmistuskokeisiin kuuluu myös nalidiksiinihappoherkkyuden toteaminen.
- 7) Indoksyyliasetaattikoe tehdään vain nalidiksiinihapolle resistentille kannoille.
- 8) 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, mikroaerofiilisiä, 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.

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

4 Periaate

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

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 katalaasiposiitiviset kannat voidaan tulkita virheellisesti katalaasinegatiivisiksi.

Hippuraatin hydrolyysikokeessa liian pieni siirros voi antaa virhenegatiivisen tuloksen.

Nalidiksiinihappoherkkyystesti voi johtaa virheelliseen tulkintaan, jos tutkittava kanta on fluorokinoloneille resistentti *C. coli*. Kotimaisissa kannoissa ei fluorokinoloniresistenssi on toistaiseksi ollut harvinaista.

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) 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) Nalidiksiinihappokiekot, 30 µg/ml
- 6) Indoksyliasettaattikiekot (esim. Rosco)
- 7) Oksidaasireagenssi
- 8) Katalaasireagenssi, 3 % vetyperoksidi
- 9) MALDI-TOF –tutkimus: ks. työohje LAB 7085

9 Kontrollikannat

- 1) *Campylobacter jejuni* EELA 446 (ATCC 33560)
- 2) *Campylobacter coli* EELA 502 (ATCC 33559)

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 ± 0,5 °C / 24 - 48 h mikroaerobisesti ja jatka inkubointia tarvittaessa 72 tuntiin saakka.

Viljele kontrollikannat aina rinnan näytteiden kanssa.

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

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 $41,5 \pm 0,5$ °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% peptonisuolaveteen 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 oksidaasiposiitivisia. Molemmat reaktiot ovat kampylobakteereilla yleensä heikkoja.

12.4 Aerobinen kasvu

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

Kampylobakteerit eivät kasva aerobisesti.

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

12.5 Biokemiallinen tunnistus

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

Laji	Hippuraatin hydrolyysi	Nalidiksiinihappoherkkyys	Indoksyyliasetaatin hydrolyysi
<i>C. jejuni</i>	+	S (tai R)*	+
<i>C. coli</i>	-	S (tai R)*	+
<i>C. lari</i>	-	R	-

* Nalidiksiinihapolle resistenttejä kantoja ei yleensä esiinny kotimaisissa näytteissä. Jos tutkittava kanta on resistentti eikä hydrolysoi hippuraattia, tehdään lisäksi indoksyyliasetaattikoe.

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.

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 Nalidiksiinihappoherkkyyskoe

Tee laimennosvedeen bakteerisuspensio, jonka sameus on McFarland 2. Viljele sitä 0,1 ml pintaleivityksenä (Toimintaohje LAB 702) veriagarille. Jos maljat ovat tuoreita, kuivaa niitä laminaarikaapissa 20 – 30 min. Käytä positiivisena kontrollina *C. jejuni* EELA 446 – bakteerikantaa.

Aseta agarin pinnalle nalidiksiinihappokiekko ja inkuboi maljaa kansi ylöspäin 37 ± 1 °C / 20 - 24 h mikroaerobisesti tai tarvittaessa pidempään.

Positiiviseksi katsotaan estovyöhyke, jonka säde on vähintään 5 - 7 mm.

12.8 Indoksyyliasetaatin hydrolyysi

Tee indoksyyliasetaatin hydrolyysikoe niille kampakylobakteerikannoille, jotka ovat resistenttejä nalidiksiinihapolle eivätkä hydrolysoi hippuraattia (työohje LAB 7074).

12.9 Varmistus MALDI-TOF –tutkimuksella

Morfologialtaan tyypillisten, liikkuvien bakteerien lajitunnistus voidaan tehdä biokemiallisten varmistustestien ja aerobisen kasvun tutkimisen sijaan MALDI-TOF – tutkimuksella työhohjeen 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 kampylobakteereita ei todeta, tulos ilmoitetaan: Kampylobakteereita ei todettu 25 g:ssa näytettä (tai tutkitussa määrässä). Jos kampylobakteereita 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.

15 Menetelmän status

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

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

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.

NMKL 119: 2007. *Campylobacter jejuni/coli*. Osoittaminen elintarvikkeista.

ISO/CD 10272-1, 2002. 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

20.5.2014 Lisätty vaihtoehtoinen varmistus MALDI-TOF –tutkimuksella. 24.10.2012 Brusellanaudanveriagar korvattu veriagarilla tai muulla ei-selektiivisellä agaralustalla, jolla kampylobakteerit kasvavat. Lisätty maininta kampylobakteerien heikosti positiivisista katalaasi- ja oksidaasireaktioista. Hippuraattikokeen tulosten lukemisen ohjetta tarkennettu. Indoksyliasetaatin hydrolyysikoe muutettu tehtäväksi erillisen työhöjeen mukaan. Laatija: Hakkinen Marjaana.