

Herstellung von quantitativem Referenzmaterial thermophiler *Campylobacter* spp. zur Verwendung in Laborvergleichsuntersuchungen oder Ringversuchen zur Methodvalidierung

Laborprotokoll des nationalen Referenzlabors für *Campylobacter*,
19. Juli 2021, v1.0

Das Nationale Referenzlabor (NRL) für *Campylobacter* ist beim Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) angesiedelt. Die Arbeit des NRL konzentriert sich auf Routine- und Forschungsarbeiten zur Charakterisierung und Differenzierung von *Campylobacter*-Isolaten, die aus Tieren, Lebensmitteln und Umweltproben stammen. Für epidemiologische Untersuchungen stehen verschiedene molekularbiologische Methoden, einschließlich der Ganzgenomsequenzierung zur Verfügung. Das NRL organisiert Laborvergleichsuntersuchungen zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *Campylobacter* in relevanten Matrices, z. B. Hühnerfleisch/-haut, Rohmilch und Hühnerkot, und stellt quantitative Referenzstandards her. Im Folgenden wird das Laborprotokoll für die Herstellung von quantitativem Referenzmaterial thermophiler *Campylobacter* spp. zur Verwendung in Ringversuchen und zur Methodvalidierung vorgestellt.

1 Hintergrund

Quantitatives Referenzmaterial wird für verschiedene Anwendungen benötigt, z. B. für Leistungstests von Kulturmedien, Qualitätskontrollen für Lebensmittelunternehmer und zuständigen Behörden sowie für quantitative Laborvergleichsuntersuchungen. Im Nachfolgenden wird ein Protokoll für die Herstellung und die Qualitätskontrolle von quantitativem thermophilen *Campylobacter*-Referenzmaterial (*C. jejuni* und *C. coli*) vorgestellt. *Campylobacter* ist ein anspruchsvolles Bakterium, das komplexe Nährstoffe und eine mikroaerobe Atmosphäre benötigt, um *in vitro* zu wachsen. Die wichtigsten Punkte des Protokolls sind die Optimierung der Kulturbedingungen und die angemessene Aufrechterhaltung der Kapazität des Bakteriums quantitativ Kolonien zu bilden (siehe Übersicht in Abb. 1).

2 Stämme und Wachstumsbedingungen

C. jejuni NCTC 11168 oder DSM 4688 und *C. coli* WDCM 00004 wurden aus -80°C Kryokulturen auf Columbia Blutagar mit 5 % defibriniertem Schafsblut in einem mikroaeroben Inkubator mit 5 % O₂, 10 % CO₂ und 85 % N₂ bei 37 °C für 24±2h bebrütet. Bei Verwendung von Flüssigkulturen wurde die mikroaerobe Atmosphäre in Drucktöpfen hergestellt, die zweimal auf -0,7 bar evakuiert und mit einem Gasgemisch aus 5 % O₂, 10 % CO₂ und 85 % N₂ aufgefüllt wurden. Als Qualitätskontrolle war ein erneutes Wachstum von einer einzelnen Kryobank-Perle bis zu einer deutlich sichtbaren Menge an Zellmaterial während 24±2h bei 37°C auf ColbA möglich.

3 Wachstum in Flüssigkultur und Kryokonservierung

Campylobacter-Stämme, die für 24±2h aus -80°C-Kryokulturen auf ColbA gezüchtet wurden, wurden für weitere 18±2h unter den gleichen Bedingungen subkultiviert. Anschließend wurden die Zellen in steril gefiltertem, vorgewärmtem Brain Heart Infusion Medium bis zu einer anfänglichen OD₆₀₀ ~ 0,3 beimpft. Die Bakterien wurden in vorgewärmten anaeroben Töpfen, die zweimal evakuiert und mit mikroaerober Atmosphäre aufgefüllt wurden, bei 140 rpm und 37°C bis zur stationären Phase für ca. 5-9h (OD₆₀₀ ~ 1,5-2) bebrütet. Die OD₆₀₀ wurde bestimmt. Auf der Grundlage einer angenommenen Generationszeit von 1,3h für *C. coli* und

1,6h für *C. jejuni* wurde die anfängliche Inokulationszeit berechnet. Das entsprechende Inokulum und ein 10-fach verdünntes Inokulum wurden in ein vorgewärmtes BHI-Medium gegeben, um über Nacht (~15-18h) zu wachsen und eine frühe stationäre Phase mit einer OD_{600} zwischen 0,8 und 1,2 zu erreichen. Die OD_{600} , die Motilität und die homogene Morphologie der Bakterien wurden geprüft, und wenn die Bakterien in ihrer Länge heterogen und kaum beweglich waren, wurde die Kultur erneut auf eine OD_{600} von ~0,3 verdünnt, um über Tag zu wachsen und nach einer weiteren Verdünnung erneut über Nacht bebrütet zu werden.

Das Kryomedium bestand aus Bolton-Basis ohne selektive Zusätze, aber mit 5 % lysiertem Pferdeblut und 10 % zellkulturgeprüftem Glycerin und wurde frisch zubereitet und auf Eis gekühlt. Nachdem eine der Kulturen mit geeigneter Qualität ausgewählt worden war, wurden die Zellen in einer bestimmten Konzentration zu eiskaltem Kryomedium hinzugefügt, wobei eine maximale Reduktion von $0,7 \log_{10}$ KbE pro ml durch das Einfrieren angenommen wurde. Dabei wurde abgeschätzt, dass eine OD_{600} von 0,2 vor dem Einfrieren ca. $8,5 \log_{10}$ KBE/ml entspricht. Kryoröhrchen wurden mit 0,1 bis 1 ml Aliquots der Kryokultur unter ständigem sanften Rühren auf Eis befüllt. Zehn Röhrchen (z. B. jedes 15. Röhrchen bei insgesamt 150 befüllten Röhrchen) wurden entsprechend ihrer Position in der Abfüllung nummeriert, um den gesamten Abfüllvorgang zu erfassen und später für den Homogenitätstest verwendet zu werden. Die Kryokultur, einschließlich der befüllten Kryoröhrchen, wurde ab dem Zeitpunkt der Inokulation des Kryomediums für mindestens 2 Stunden, aber nicht länger als 4 Stunden auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Röhrchen mindestens zehn Sekunden lang in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie auf Trockeneis und schließlich in vorgekühlte Boxen zur Langzeitlagerung bei -80 °C überführt wurden. Temperaturschwankungen während der Abfüllung und anschließend während der Lagerung sollten vermieden werden, um die KbE-Kapazität zu erhalten.

4 Analyse der Leistungskriterien

Die Keimzählung wurde von der Kultur vor dem Einfrieren durchgeführt. Nach dem Einfrieren und der Lagerung für mindestens einen Tag wurde die Keimzählung für zwei Replikatröhrchen und zwei Verdünnungen durchgeführt, um den Verlust an KbE aufgrund des Einfrier-Auftau-Prozesses abzuschätzen und eine geeignete Verdünnung für die Durchführung des Homogenitätstests von zehn während des Abfüllvorgangs entnommenen Röhrchen zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden die Röhrchen 15 bis 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut (je nach Volumen) und anschließend für mindestens 30 min bis zu drei Stunden auf Eis inkubiert, um eine optimale Rückgewinnung der KbE zu gewährleisten. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen in gepuffertem 1%igen Peptonwasser verdünnt und auf zwei ColbA-Platten für eine mikroaerobe Inkubation für 48 Stunden bei $41,5\text{ °C}$ plattiert.

4.1 Bewertung der Homogenität

Zehn Röhrchen pro Charge wurden entlang der gesamten Abfülllinie ausgewählt und gemäß ISO 13528:2015 auf ihre Homogenität geprüft. Von jedem Röhrchen wurden drei Testportionen (Replikate) durch Keimzählung einer geeigneten Verdünnung auf zwei ColbA-Platten pro Replikat und Röhrchen untersucht. Die geeignete Verdünnung wurde auf der Grundlage der nach dem Einfrieren (siehe oben) erhaltenen KbE berechnet, wobei angestrebt wurde, ~50 Kolonien pro Platte zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde die Verdünnung in gepuffertem 1%igem Peptonwasser für die Röhrchen 1 bis 10 durchgeführt, und 100µl der verdünnten Suspension auf zwei ColbA-Platten (Replikat 1) aufgetragen. Danach wurde die Verdünnungsreihe verworfen und die Röhrchen 1 bis 10 erneut verdünnt und zweifach ausplattiert (Replikat 2). Analog dazu wurde Replikat 3 für die zehn Röhrchen durchgeführt. Die Platten

wurden 48 Stunden lang bei 41,5 °C unter mikroaeroben Bedingungen bebrütet. Die Standardabweichung (s_s) zwischen den Proben wurde mit der Standardabweichung für die Eignungsbeurteilung σ_{pt} verglichen. Gemäß ISO 13528:2015 gilt die Homogenität als ausreichend, wenn die Standardabweichung s_s das 0,3-fache der Standardabweichung für die Eignungstests σ_{pt} nicht übersteigt. σ_{pt} definiert den akzeptablen Grad der Abweichung zwischen Laboratorien für einen bestimmten Test. Für den Fall, dass keine historischen Daten für das Referenzmaterial verfügbar sind, wird σ_{pt} für mikrobielle Eignungsprüfungen gemäß ISO 22117:2018 auf einen festen Wert von $0,35 \log_{10}$ gesetzt. Da eine technisch bedingte hohe Intra-Standardabweichung inhomogenes Material fälschlich als homogen darstellen könnte, wurde außerdem eine maximale Differenz zwischen allen gemessenen \log_{10} KbE-Werten von $0,5 \log_{10}$ und eine maximale Intra-Standardabweichung von $0,1 \log_{10}$ definiert.

4.2 Bewertung der Stabilität

Für die Stabilitätsbewertung wurden mindestens fünf Zeitpunkte gewählt, an denen zwei Röhrrchen pro Charge gemäß ISO 13528:2015 ausgezählt wurden. Die beiden Replikate wurden wie oben beschrieben vorbereitet und ausplattiert. Als erster und zweiter Stabilitätszeitpunkt wurden die Daten der beiden Röhrrchen nach direktem Einfrieren und zwei zufällig aus dem Homogenitätstest-Datensatz ausgewählte Röhrrchen verwendet. Das Referenzmaterial galt als stabil, wenn die absolute Differenz zwischen dem Gesamtdurchschnitt der Homogenitätsprüfung (\bar{x}) und dem Gesamtdurchschnitt der Stabilitätsprüfung (\bar{y}) das 0,3-fache der Standardabweichung für Eignungstests σ_{pt} (definiert als $0,35 \log_{10}$, siehe oben; ISO 13528:2015) plus erweiterte Unsicherheit nicht überstieg. Daher wurde geprüft, ob $(|\bar{x} - \bar{y}|) < 0,3 \sigma_{pt} + 2u$ (ISO 13528:2015, B.5.2), mit $u = s_{IR}/\sqrt{n}$ und n , Anzahl der Stabilitätszeitpunkte. Die Unsicherheit wurde aus der laborinternen Standardabweichung (s_{IR}) gemäß ISO 19036:2020, 5.2.2.3.2 geschätzt.

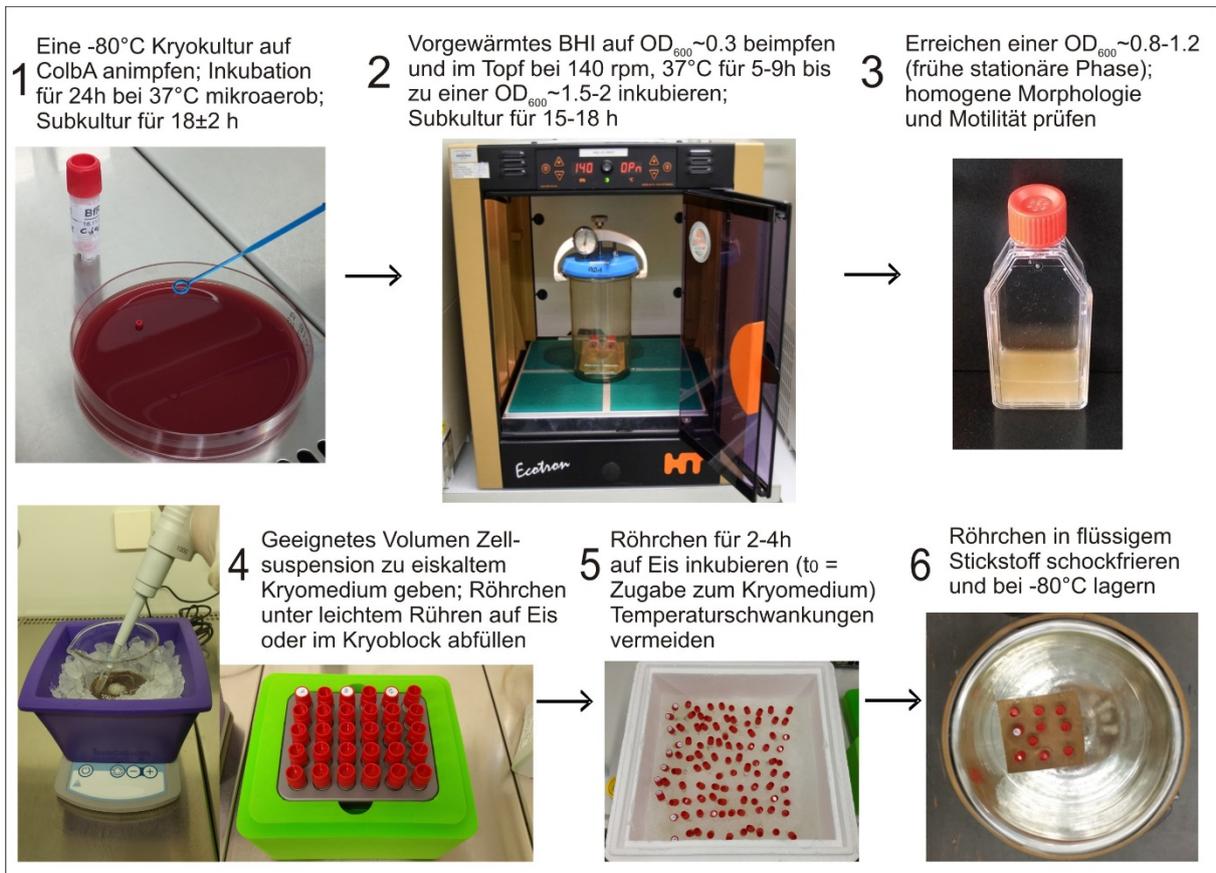


Abbildung 1: Überblick über das Verfahren zur Herstellung von quantitativem Referenzmaterial von thermophilem *Campylobacter* spp.

5 Referenzen

ISO 13528:2015 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. International Standards Organization, Geneva, Switzerland.

ISO 22117:2018. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 19036:2020. Microbiology of the food chain - Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Über das BfR

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ist eine wissenschaftlich unabhängige Einrichtung im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Es berät die Bundesregierung und die Bundesländer zu Fragen der Lebensmittel-, Chemikalien- und Produktsicherheit. Das BfR betreibt eigene Forschung zu Themen, die in engem Zusammenhang mit seinen Bewertungsaufgaben stehen.