



m-CCDA Agar
CAMPYLOBACTER BLOOD
FREE MEDIUM BASE BOLTON (m-CCDA)
BOLTON CCDA ANTIMICROBIC SUPPLEMENT
CAMPYLOBACTER BLOOD FREE AGAR (CCDA BOLTON)

Milieu de culture et complément sélectif déshydratés et prêts à l'emploi

1 - UTILISATION PREVUE

Milieu sélectif pour l'isolement de *Campylobacter* spp. dans les denrées alimentaires et autres échantillons.

2 - COMPOSITION***CAMPYLOBACTER BLOOD FREE MEDIUM BASE BOLTON - MILIEU DESHYDRATE****FORMULE TYPE (APRES RECONSTITUTION AVEC 1 L D'EAU)**

Beef extract	10.00 g
Peptone	10.00 g
Tryptone	3.00 g
Sodium chloride	5.00 g
Charcoal	4.00 g
Sodium deoxycholate	1.00 g
Ferrous sulphate	0.25 g
Sodium pyruvate	0.25 g
Agar	15.50 g

BOLTON CCDA ANTIMICROBIC SUPPLEMENT**(CONTENU DES FLACONS POUR 500 ML DE MILIEU)**

Cefoperazone	16 mg
Amphotericin B	5 mg

CAMPYLOBACTER BLOOD FREE AGAR (CCDA BOLTON) - PLAQUES PRETES A L'EMPLOI

Campylobacter sans sang Milieu de base	Bolton	49 g
Cefoperazone		32 mg
Amphotericin B		10 mg
Purified water		1000 mL

*Les formules peuvent être ajustées et/ou complétées pour répondre aux critères de performance requis.

3 - PRINCIPE DE LA METHODE ET EXPLICATION DE LA PROCEDURE

Depuis le début des années 1970, lorsque *C. jejuni* et *C. coli* ont été reconnus comme des agents d'infections gastro-intestinales associées à des intoxications alimentaires, plusieurs milieux de culture liquides et en plaques ont été développés, conçus à l'origine pour l'examen des fèces, puis étendus à la détection de *Campylobacter* dans les aliments et l'eau.¹

Les milieux sélectifs pour l'isolement de *Campylobacter* se composent d'une base non sélective à utiliser avec ou sans sang animal et d'un mélange de composés antimicrobiens ; parmi les milieux d'isolement proposés dans la littérature, la revue de Corry et Atabay¹ mentionne les milieux suivants : Skirrow, Blaser Wang, Preston, mCCD Bolton, mCCD Hutchinson et Bolton, Karmali, Line TTC.

Les formulations sans sang (par exemple, mCCDA, Karmali) semblent avoir de meilleures performances que les milieux contenant du sang.²

Le milieu Campylobacter exempt de sang CCDA Bolton est préparé selon la formulation proposée par Bolton, Hutchinson et Coates³ et modifiée ultérieurement par le remplacement de cefazoline par cefoperazone pour améliorer les propriétés de sélectivité.⁴ Le milieu est recommandé par ISO 10272^{5,6} pour la détection et le dénombrement de *Campylobacter* spp. dans des échantillons de la chaîne alimentaire et par ISO 17995⁷ pour la détection et le dénombrement de *Campylobacter* spp. thermotolérants dans l'eau. Il est inclus par APHA⁸ et FDA-BAM⁹ dans la gamme des géloses isolantes sélectives pour la détection de *Campylobacter* dans les aliments.

Le milieu est également connu sous le nom de "gélose au céfopérazone désoxycholate de charbon modifié (gélose mCCD)"

L'extrait de bœuf, la tryptone et la peptone fournissent de l'azote, du carbone, des minéraux et des acides aminés pour la croissance microbienne. Le charbon de bois, le pyruvate de sodium et le sulfate ferreux améliorent l'isolement et la tolérance à l'oxygène de *Campylobacter* spp. en neutralisant les anions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène qui se produisent spontanément dans le milieu de culture¹⁰ ; le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique. Les agents sélectifs du milieu sont : le désoxycholate de sodium actif contre les bactéries Gram-positives, la céfopérazone qui supprime principalement la croissance des bactéries Gram-négatives et l'amphotéricine B, incluse en tant que composé antifongique.

4- INSTRUCTIONS POUR LA PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE

Suspendre 24.5 g de Campylobacter Blood Free Medium Base Bolton dans 500 mL d'eau froide purifiée. Chauffer jusqu'à ébullition en agitant fréquemment, stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et refroidir à 47-50°C. Ajouter le contenu d'un flacon de supplément antimicrobien Bolton CCDA (REF 4240020) reconstitué avec 5 mL d'eau purifiée stérile. Bien mélanger et verser dans des boîtes de Pétri stériles.

5 - CARACTERISTIQUES PHYSIQUES**Campylobacter sans sang Milieu de base Bolton**

Aspect du milieu déshydraté	poudre noire, fine, homogène, fluide
Aspect de la solution et des plaques préparées	noir opaque
pH final à 20-25 °C	7.4 ± 0.2



**Campylobacter Blood Free Medium Base Bolton**

Complément lyophilisé aspect pastille courte, jaunâtre
Aspect du complément reconstitué jaune pâle, opalescent

6 - MATÉRIEL FOURNI - EMBALLAGE

Produit	Type	REF	Emballage
Campylobacter Blood Free Medium Base Bolton (m-CCDA)	Milieu déshydraté	4012822	500 g (10.2 L)
Bolton CCDA Antimicrobial Supplement	Supplément lyophilisé	4240020	10 flacons, chacun pour 500 mL de milieu
Campylobacter Blood Free Agar (CCDA Bolton)	Plaques prêtes à l'emploi	541282	2 x 10 plaques ø 90 mm

7 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Autoclave, bain-marie, bouches et écouvillons stériles, incubateur et équipement de laboratoire nécessaire, boîtes de Pétri, filtres à membrane stériles, fioles d'Erlenmeyer, générateurs à atmosphère contrôlée et bocal, milieux de culture et réactifs auxiliaires.

8 - SPECIMENS

Eau, denrées alimentaires, aliments pour animaux, échantillons environnementaux dans le domaine de la production et de la manipulation des denrées alimentaires. Se référer aux normes internationales applicables⁵⁻⁷ pour la collecte, le transport, le stockage et la préparation des échantillons et travailler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

9 - PROCEDURE D'ESSAI

Selon la norme ISO 10272-1, trois procédures différentes de détection de *Campylobacter* peuvent être utilisées en fonction du type d'échantillon et de l'objectif du test :

- détection de *Campylobacter* par enrichissement, dans des échantillons présentant un faible nombre de *Campylobacter* et un faible niveau de microflore de fond et/ou avec des *Campylobacter* stressés : enrichissement dans un bouillon de Bolton* avec incubation dans une atmosphère microaérobie à 37 °C pendant 4 h à 6 h, puis à 41.5 °C pendant 44 h.
- détection de *Campylobacter* par enrichissement, dans des échantillons présentant un faible nombre de *Campylobacter* et un niveau élevé de microflore de fond : enrichissement dans un bouillon de Preston[^] avec incubation dans une atmosphère microaérobie à 41,5 °C pendant 24 heures.
- la détection de *Campylobacter* par ensemencement direct, dans les échantillons contenant un nombre élevé de *Campylobacter*.

Procédure de détection A : à partir de la culture d'enrichissement dans le bouillon de Bolton, ensemercer deux milieux solides sélectifs :

- Agar mCCD
- tout autre milieu sélectif solide pour *Campylobacter* utilisant un principe sélectif différent.

Procédure de détection B : à partir de la culture d'enrichissement dans le bouillon de Preston, inoculer les plaques de gélose mCCDA.

Procédure de détection C : la portion testée est déposée directement ou après avoir été mise en suspension dans une quantité appropriée de liquide sur les plaques d'agar mCCD.

Les géloses d'isolement sélectif sont incubées à 41.5 °C dans une atmosphère microaérobie et examinées après 44 heures pour détecter la présence de colonies suspectes de *Campylobacter*.

En général, la détection de *Campylobacter* dans l'eau conformément à la norme ISO 17995 nécessite un enrichissement suivi de l'isolement des colonies et de leur confirmation.⁷ Les échantillons pour lesquels on s'attend à un niveau de contamination élevé sont inoculés directement dans le bouillon de Preston ; lorsque le niveau attendu de micro-organismes de fond est faible et que les échantillons ne peuvent être traités par filtration sur membrane, le bouillon de Bolton peut être utilisé. Si aucune information sur le niveau de contamination n'est disponible, les deux bouillons doivent être utilisés. Les bouillons d'enrichissement incubés sont inoculés sur des plaques mCCDA et incubés à 41,5 ± 1 °C pendant 44 ± 4 heures.

* Bouillon Bolton : Campylobacter Bolton Broth Base REF 401286B2 + Bolton Broth Selective Supplement REF 4240025.

[^] Bouillon Preston : Bouillon nutritif n° 2 REF 401812S2 + Preston Antimicrobial Supplement REF 4240022 + Lysed Horse Blood REF 90HLX100.

10 - LECTURE ET INTERPRÉTATION

Après incubation, observer la croissance bactérienne et noter les caractéristiques morphologiques et chromatiques spécifiques des colonies.

Les colonies de *Campylobacter* sont généralement grisâtres sur la gélose mCCD, souvent avec un reflet métallique, et sont plates et humides, avec une tendance à l'étalement. Les colonies ont tendance à s'étendre moins sur des surfaces de gélose plus sèches. D'autres formes de colonies peuvent apparaître.

Les colonies suspectes de *Campylobacter* sont examinées au microscope pour vérifier leur morphologie et leur motilité et sont cultivées sur une gélose au sang non sélective, puis confirmées par la détection de l'activité oxydase et par un test de croissance aérobie à 25 °C. Les espèces de *Campylobacter* sont éventuellement identifiées par des tests biochimiques spécifiques et/ou des méthodes moléculaires.

Pour une explication complète des critères et méthodes d'identification, se référer à la référence citée.⁵⁻⁹

11 - CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DE L'UTILISATEUR

Tous les lots de produits fabriqués sont mis en vente après que le contrôle de qualité a été effectué pour vérifier la conformité aux spécifications. Toutefois, l'utilisateur final peut effectuer son propre contrôle de qualité conformément aux réglementations locales applicables, aux exigences d'accréditation et à l'expérience du laboratoire. On trouvera ci-dessous une liste de souches d'essai utiles pour le contrôle de la qualité.

SOUCHES TEMOINS	INCUBATION T° / T / ATM	RESULTATS ATTENDUS
<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	40,5-42,5°C / 40-48h / M	bonne croissance
<i>C. coli</i> ATCC 43478	40,5-42,5°C / 40-48h / M	bonne croissance
<i>E. coli</i> ATCC 25922	40,5-42,5°C / 40-48h / M	inhibé
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	40,5-42,5°C / 40-48h / M	inhibé

M : incubation microaérobie ; ATCC est une marque déposée de l'American Type Culture Collection.





12 - CARACTERISTIQUES DES SPECTACLES

Avant la mise en vente, des échantillons représentatifs de tous les lots de déshydraté *Campylobacter Blood Free Medium Base Bolton* complété par Bolton CCDA Antimicrobial Supplement et des plaques prêtes à l'emploi de *Campylobacter Blood Free Agar CCDA Bolton*, sont testés pour la productivité et la sélectivité en comparant les résultats avec les lots de référence et la gélose Tryptic Soy Agar (TSA) précédemment approuvés.

La productivité est testée par un test quantitatif avec les souches cibles *C. coli* ATCC 43478 et *C. jejuni* ATCC 29428 ; des plaques de gélose mCCDA sont inoculées avec des dilutions décimales dans une solution saline des suspensions de colonies et incubées à 42°C pendant 40-48 heures dans une atmosphère microaérobie. Les colonies sont dénombrées sur le lot de test (TB) et le TSA et le ratio de productivité ($Pr = \frac{CFU}{CFU_{TBSA}}$) est calculé. Si Pr est $\geq 0,5$, les résultats sont considérés comme acceptables et conformes aux spécifications.

La sélectivité est évaluée à l'aide de la méthode modifiée des gouttes de surface de Miles-Misra en inoculant les plaques avec des dilutions décimales appropriées dans une solution saline d'une suspension de 0.5 McFarland des souches non ciblées *C. albicans* ATCC 18804, *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 19433. *C. albicans* est partiellement inhibé alors que la croissance des autres souches non ciblées est totalement inhibée.

13 - LIMITES DE LA MÉTHODE

- Les contaminants les plus nombreux trouvés dans le milieu gélosé mCCD sont les *entérobactéries*, qui sont résistantes à la céfopérazone lorsqu'elles sont présentes en grand nombre, en particulier *Klebsiella oxytoca*.¹
- Même si les colonies microbiennes sur les plaques sont différenciées sur la base de leurs caractéristiques morphologiques et chromatiques, il est recommandé d'effectuer des tests biochimiques, immunologiques, moléculaires ou de spectrométrie de masse sur les isolats, à partir d'une culture pure, pour une identification complète.

14 - PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- Le milieu de base, le supplément et les plaques prêtes à l'emploi sont destinés au contrôle microbiologique et à un usage professionnel uniquement ; ils doivent être utilisés par un personnel de laboratoire dûment formé et qualifié, en observant les précautions approuvées contre les risques biologiques et les techniques aseptiques.
- Le milieu de base et le supplément doivent être utilisés en association conformément au mode d'emploi décrit. Appliquer les bonnes pratiques de fabrication dans le processus de production des milieux préparés.
- Les milieux déshydratés doivent être manipulés avec une protection adéquate. Le supplément antimicrobien Bolton CCDA est classé comme dangereux. Avant toute utilisation, consulter les fiches de données de sécurité.
- Ce milieu de culture contient des matières premières d'origine animale. Les contrôles ante et post mortem des animaux et ceux effectués au cours du cycle de production et de distribution des matières premières ne peuvent garantir totalement que le produit ne contient aucun agent pathogène transmissible. Il est donc recommandé de traiter le milieu de culture comme potentiellement infectieux et de le manipuler en observant les précautions spécifiques habituelles : ne pas ingérer, inhaler ou laisser entrer en contact avec la peau, les yeux ou les muqueuses. Télécharger la déclaration EST sur le site www.biolifeitaliana.it, qui décrit les mesures mises en œuvre par Biolife Italiana pour réduire les risques liés aux maladies animales infectieuses.
- Soyez prudent lorsque vous ouvrez l'anneau métallique des flacons afin d'éviter toute blessure.
- Le supplément est stérilisé par filtration sur membrane.
- Chaque plaque de ce milieu de culture est à usage unique.
- Les plaques prêtes à l'emploi ne doivent pas être considérées comme un "produit stérile" car elles ne sont pas soumises à une stérilisation terminale, mais comme un produit dont la biocontamination est contrôlée, dans les limites des spécifications définies dans le certificat de contrôle de la qualité.
- Tous les échantillons de laboratoire doivent être considérés comme infectieux.
- La zone de laboratoire doit être contrôlée afin d'éviter les contaminants tels que la poudre de milieu et le supplément ou les agents microbiens.
- Stériliser tous les déchets à risque biologique avant de les éliminer. Éliminer le milieu et le supplément non utilisés ainsi que les plaques inoculées avec des échantillons ou des souches microbiennes conformément à la législation locale en vigueur.
- Ne pas utiliser le milieu de culture et le complément comme principes actifs de préparations pharmaceutiques ou comme matériaux de production destinés à la consommation humaine et animale.
- Les certificats d'analyse et les fiches de données de sécurité sont disponibles sur le site www.biolifeitaliana.it.
- Les informations fournies dans ce document ont été définies au mieux de nos connaissances et de nos capacités et représentent une ligne directrice pour l'utilisation correcte du produit, mais sans obligation ni responsabilité. Dans tous les cas, les lois, réglementations et procédures standard locales en vigueur doivent être respectées pour l'examen des échantillons prélevés dans les districts organiques humains et animaux, pour les échantillons environnementaux et pour les produits destinés à la consommation humaine ou animale. Nos informations ne dispensent pas nos clients de leur responsabilité de vérifier l'adéquation de notre produit à l'usage auquel il est destiné.

15 - CONDITIONS DE STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Plaques prêtes à l'emploi

Dès réception, conserver les plaques dans leur emballage d'origine à une température comprise entre 2 et 8 °C, à l'abri de la lumière directe. Si elles sont correctement conservées, les plaques peuvent être utilisées jusqu'à la date de péremption. Ne pas utiliser les plaques au-delà de cette date. Les plaques provenant d'un sachet plastique ouvert peuvent être utilisées pendant 7 jours si elles sont conservées dans un endroit propre à 2-8°C. Ne pas utiliser les plaques si le sachet en plastique est endommagé ou si le plat est cassé. Ne pas utiliser les plaques présentant des signes de détérioration (par exemple, contamination microbienne, déshydratation, rétrécissement ou fissuration du milieu, couleur atypique, excès d'humidité).

Milieu déshydraté

Dès réception, conserver à +10°C /+30°C à l'abri de la lumière et dans un endroit sec. S'il est correctement stocké, il peut être utilisé jusqu'à la date de péremption. Ne pas utiliser au-delà de cette date. Éviter d'ouvrir le flacon dans un endroit humide. Après utilisation, le récipient doit être fermé hermétiquement. Jeter le produit si le récipient et/ou le bouchon sont endommagés, ou si le récipient n'est pas bien fermé, ou en cas de détérioration évidente de la poudre (changement de couleur, durcissement, gros morceaux).

Supplément lyophilisé

Dès réception, conserver le produit dans son emballage d'origine à une température comprise entre 2 et 8°C, à l'abri de la lumière directe. S'il est correctement conservé, le produit peut être utilisé jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette ; ne pas utiliser au-delà de cette date. Après ouverture du flacon et reconstitution du produit lyophilisé, la solution obtenue doit être utilisée immédiatement. Avant
















utilisation, examiner le produit lyophilisé et reconstitué et le jeter s'il présente des signes évidents de détérioration (par exemple, contamination, couleur atypique ou autres caractéristiques anormales).

L'utilisateur est responsable des processus de fabrication et de contrôle de la qualité des milieux préparés et de la validation de leur durée de conservation, en fonction du type (plaques/bouteilles) et des conditions de stockage appliquées (température et emballage). Selon la norme ISO 17995, les plaques mCCDA préparées par l'utilisateur peuvent être conservées à 5 ± 3 °C dans des sacs hermétiques, à l'abri de la lumière, pendant 10 jours au maximum, tandis que la base du milieu peut être conservée dans des bouteilles hermétiques, à l'abri de la lumière, à 5 ± 3 °C, pendant un mois au maximum.⁷

16 - RÉFÉRENCES

1. Corry JEL, Atabay HI. Culture Media for the Isolation of Campylobacters, Helicobacters and Arcobacters. *in Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology*, Edited by Corry JEL, Curtis GDW, Baird RM. Published by the Royal Society of Chemistry, 3rd Edition 2012.
2. Fitzgerald C, Nachamkin I. Campylobacter and Arcobacter. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. *Manual of clinical microbiology*, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.998.
3. Bolton FJ, Hutchinson DN, Coates D. A blood-free selective medium for the isolation of C.jejuni from faeces. *J Clin Microbiol* 1984; 19:169.
4. Hutchinson DN, Bolton FJ. Improved blood-free medium for the isolation of Campylobacter jejuni from faecal specimens. *J. Clin. Pathol.* 1984, 37 pp. 956 – 957
5. ISO 10272-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. — Part 1: Detection method
6. ISO 10272-2:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. — Part 2: Colony-count technique
7. ISO 17995:2019 Water quality — Detection and enumeration of thermotolerant Campylobacter spp
8. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015.
9. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM), online. Chapter 7: Campylobacter. Content current as of: 08/03/2021
10. Karmali, M.A., Simor, A.E., Roscoe, M., Fleming, P.C., Smith, S.S., Lane, J. (1986) *J. Clin. Microbiol.* 21, 456-59

TABLEAU DES SYMBOLES APPLICABLES

 ou  Numéro de catalogue	 Code du lot	 Tenir à l'écart de la lumière directe	 Fabricant	 De ce côté-ci	 Stocker dans un endroit sec
 Limitation de la température	 Contenu suffisant pour <n> tests	 Consulter le mode d'emploi	 Utiliser avant	 Fragile	

HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Version	Description des changements	Date
Révision 1	Alignement sur l'index de révision de la langue anglaise	2022/06
Révision 2	Mise à jour du tableau des symboles	2024/02

Note : les modifications typographiques, grammaticales et de formatage mineures ne sont pas incluses dans l'historique des révisions.

