

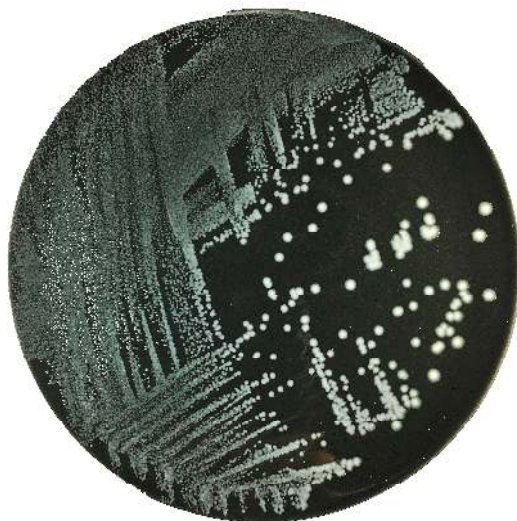


ISTRUZIONI PER L'USO

CAMPYLOBACTER BLOOD FREE MEDIUM BASE (KARMALI)

KARMALI ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

Terreno di base in polvere e supplemento selettivo.



Campylobacter coli su piastra di
Campylobacter Blood Free Agar (Karmali),

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Terreno di base in polvere e supplemento selettivo per l'isolamento dei *Campylobacter* termofili da campioni clinici e da altri materiali.

2 - COMPOSIZIONE**CAMPYLOBACTER BLOOD FREE MEDIUM BASE (KARMALI),
FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA)***

Peptocomplex	10,000 g
Triptosio	10,000 g
Peptone	3,000 g
Amido di mais	1,000 g
Sodio cloruro	5,000 g
Carbone vegetale	4,000 g
Ematina	0,032 g
Sodio piruvato	0,100 g
Cicloesimide	0,100 g
Agar	14,000 g

* Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche

KARMALI ANTIMICROBIC SUPPLEMENT**CONTENUTO DEL FLACONE PER 500 ML DI TERRENO**

Cefoperazone	16 mg
Vancomicina	10 mg

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Campylobacter è un piccolo bastoncino Gram negativo, ossidasi positivo, dotato di un flagello polare ad una o ad entrambe le estremità, a forma elicoidale, ricurva ad "S" o a "V", mobile, con una caratteristica mobilità "a cavatappo".¹ Per la loro crescita è richiesta un'atmosfera microaerobica con una concentrazione di ossigeno ridotta al 5-6%. Le specie più comunemente associate alle malattie nell'uomo sono termotolleranti: crescono a 42°C- 43°C ed a 37°C, ma non a 25°C. *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei*, *Campylobacter fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* non crescono a 42°C.² *Campylobacter* provoca una tossinfezione alimentare (campilobatteriosi), tra le più frequenti in Europa, caratterizzata da una sintomatologia variabile da lieve a grave che può includere diarrea con o senza sangue nelle feci, dolori addominali, febbre, cefalea, nausea e vomito; infezioni extraintestinali sono state riportate a seguito di enterite da *Campylobacter* in circa lo 0,15% dei pazienti, di solito in soggetti molto anziani o molto giovani, e comprendono batteriemia, epatite, pancreatite, meningite, endocardite, artrite settica, aborto, sepsi neonatale; l'infezione da *C.jejuni* precede spesso l'insorgenza della sindrome di Guillain-Barré.¹ *Campylobacter* è trasmissibile attraverso il consumo di derrate alimentari contaminate, in modo particolare pollame, carne e prodotti non cotti, frutti di mare, acqua non trattata, o latte e dal contatto con gli animali "serbatoio". La maggior parte delle infezioni è provocata dalle specie *C. jejuni* subsp. *jejuni* e *C. coli*, mentre meno frequenti sono quelle causate dalle specie *C.lari*, *C.fetus* subsp. *fetus*, *C.jejuni* subsp. *doylei* e *C.upsaliensis*.

Dagli anni settanta, quando si incominciò ad associare *Campylobacter* alle tossinfezioni alimentari, sono stati sviluppati numerosi terreni di coltura liquidi ed agarizzati, originariamente studiati per l'esame delle feci e poi estesi alla ricerca di *Campylobacter* negli alimenti e nell'acqua e costituiti essenzialmente da una base non selettiva da impiegare con o senza sangue animale e da miscele di composti antimicrobici; tra i terreni d'isolamento proposti in letteratura, la rassegna di Corry e Atabay³ cita i terreni Skirrow, Blaser Wang, Preston, mCCD Bolton, mCCD Hutchinson e Bolton, Karmali, Line TTC.

Campylobacter Blood Free Medium Base Karmali ed il supplemento selettivo Karmali Antimicrobic Supplement sono preparati secondo la formulazione ideata da Karmali nel 1986.⁴ Campylobacter Blood Free Medium Karmali e Karmali Supplement sono destinati all'isolamento dei campylobacter termo tolleranti dalle feci e da altri campioni non clinici.

Il terreno di Karmali *et al.* è una variazione del terreno mCCDA di Bolton, Hutchinson e Coats⁵, ove l'ematina è impiegata al posto del solfato ferroso, la vancomicina invece del sodio desossicolato e la cicloesimide in sostituzione della amfotericina B.

Gli agenti selettivi del terreno sono: la vancomicina, con una forte attività inibitoria contro i batteri Gram positivi, il cefoperazone, che sopprime principalmente la crescita dei batteri Gram negativi e la cicloesimide, inclusa come composto antifungino. Il carbone (in sostituzione del sangue animale), l'ematina ed il piruvato di sodio stimolano la crescita di *Campylobacter*, aumentano la sua aerotolleranza e inibiscono i composti tossici che si formano durante la crescita.

Il terreno Karmali (KM) è stato confrontato con il terreno Skirrow (SKM) per l'isolamento di *C. jejuni* e *C. coli* dalle feci di pazienti con diarrea.³ Gli organismi target sono stati isolati da 35 (2,9%) su 1.227 feci testate (29 su entrambi terreni, 5 solo su KM e uno solo su SKM). Gli isolamenti di *C. jejuni* e *C. coli* sono stati in coltura pura in 29 campioni con KM (85%), ed in 11 campioni con SKM (37%). La soppressione completa della flora "contaminante" si è verificata in 704 colture KM (57%) rispetto alle 426 colture SKM (35%).

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 24,1 g di polvere in 500 mL di acqua purificata fredda; portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 118°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e aggiungere il contenuto di un flacone di Karmali Antimicrobic Supplement (REF 4240035), ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Mescolare bene e distribuire in piastre di Petri sterili.



**5 - CARATTERISTICHE FISICHE****Campylobacter Blood Free Medium Base Karmali**

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, nera

Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra

terreno opaco di colore nero

pH (20-25°C)

7,4 ± 0,2

Karmali Antimicrobial Supplement

Aspetto del liofilizzato

pastiglia bassa, compatta, biancastra

Aspetto della soluzione

limpida, incolore

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Campylobacter Blood Free Medium Base Karmali	Terreno in polvere	4012832	500 g (10,4 L)
Karmali Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilizzato	4240035	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori, materiali per la generazione dell'atmosfera di incubazione controllata.

8 - CAMPIONI

I campioni fecali sono preferibili per isolare *Campylobacter* spp. da pazienti con infezioni gastrointestinali; tuttavia, sono anche accettabili i tamponi rettali.³ Se possibile raccogliere i campioni prima dell'inizio della terapia antibiotica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente.

- Feci solide: le feci possono essere diluite 1: 4 in acqua peptonata 0.1% o in soluzione fisiologica sterile. È stato dimostrato che la diluizione riduce significativamente la quantità di flora contaminante senza compromettere l'isolamento degli agenti patogeni anche se presenti in bassa carica.² Mescolare bene quindi inoculare sulla piastra 3-5 gocce di sospensione.
- Feci liquide: inoculare 3 gocce sulla superficie della piastra.
- Tampone rettale: rotolare il tampone su una piccola area in prossimità del bordo piastra

Per tutti i campioni comunque strisciare con un'ansa sterile il campione sui 4 quadranti della piastra per ottenere colonie isolate assicurandosi che le sezioni 1 e 4 non si sovrappongano.

Incubare a 39-42°C in atmosfera microaerobica (10% CO₂; 5-6% O₂; 84-85% N₂) per 40-48 ore.²

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica delle colonie.

Campylobacter jejuni cresce con colonie piccole, mucose, piatte con bordi irregolari. Le colonie tendono a sciamare.

Le specie di *Campylobacter* sono ossidasi positive. Se una colonia che fenotipicamente appare come *Campylobacter* fosse ossidasi negativa, trapiantare su agar sangue e ripetere il test dopo incubazione di 24 ore.⁶

L'identificazione presuntiva dei campylobacter termofili ed enteropatogeni può essere fatta sulla base delle positività al test dell'ossidasi ed alla mobilità caratteristica a fresco.

Per una descrizione completa dei criteri e dei metodi di identificazione, fare riferimento alla bibliografia citata.⁶

11 - CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.¹⁰

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE (T° / t / ATM)	RISULTATI ATTESI
<i>C.jejuni</i> ATCC 33291	39-42°C / 40-48 h / M	buona crescita
<i>C.coli</i> ATCC 43478	39-42°C / 40-48 h / M	buona crescita
<i>E.coli</i> ATCC 25922	39-42°C / 40-48 h / M	crescita parzialmente o totalmente inibita
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	39-42°C / 40-48 h / M	crescita inibita

A: incubazione in aerobiosi; M: incubazione in microaerofilia; A: Aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere *Campylobacter Blood Free Medium Base Karmali* preparati in piastra con l'aggiunta di *Karmali Antimicrobial Supplement* vengono testati per la produttività e la selettività avendo come riferimento lotti precedentemente approvati e considerati come Lotti di Riferimento.

La produttività è saggiata con metodo quantitativo con i ceppi target *C.coli* ATCC 43478 and *C.jejuni* ATCC 33291. Le piastre di terreno *Karmali* del lotto in esame (TB) e del lotto di riferimento (RB), sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina di sospensioni delle colonie dei ceppi target. Dopo incubazione a 39-42°C per 40-48 ore in microaerofilia, vengono contate le colonie sviluppate sui due lotti e calcolato l'indice di produttività ($Pr = UFC_{TB} / UFC_{RB}$). Nel caso Pr sia superiore o uguale a 0,7 i risultati sono giudicati conformi.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato appropriate diluizioni di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non target *C.albicans* ATCC 18804, *E.coli* ATCC 8739, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 19433. Dopo incubazione *C.albicans* risulta parzialmente inibita mentre gli altri ceppi non target sono completamente inibiti.

Le piastre di *Campylobacter Blood Free Agar (Karmali)* preparate come sopra descritto, sono state valutate in una sperimentazione clinica su 198 coproculture avendo come riferimento il terreno CCDA Preston.⁷ In 8 campioni è stato rinvenuto *Campylobacter*. su entrambi i





terreni ma, mentre sul terreno Karmali 5 volte è stato ritrovato in coltura pura, sul terreno CCDA Preston è stato ritrovato solo 2 volte. Non sono state trovate differenze significative tra i due terreni per quanto riguarda la crescita della flora microbica contaminante di lieviti e di bacilli Gram negativi; differenze significative, a favore del terreno Karmali, sono state calcolate per quanto riguarda l'inibizione dei batteri Gram positivi.

13 - LIMITI DEL METODO

- I contaminanti che più frequentemente si ritrovano sul terreno sono *Enterobacteriaceae* resistenti al cefoperazone, se presenti in numero elevato, in particolare *Klebsiella oxytoca*.¹
- Per ottenere i migliori tassi di isolamento di *Campylobacter* dai campioni fecali, è raccomandabile una combinazione di terreni che includa il terreno Karmali e un secondo terreno basato su un diverso sistema selettivo (ad esempio, il terreno Skirrow).⁸
- L'estensione del tempo di incubazione da 48 a 72 ore comporta un aumento delle percentuali di isolamento.⁸
- Le formulazioni prive di sangue (ad es. Karmali, CCDA) sembrano avere prestazioni migliori rispetto ai terreni contenenti sangue.³
- Non vi sono adeguate evidenze sperimentali che dimostrino in maniera univoca il vantaggio clinico dell'uso dei brodi di arricchimento formulati per migliorare il recupero di *Campylobacter*.³ L'arricchimento sembra non essere necessario per i campioni raccolti nella fase acuta di campilobatteriosi, mentre il recupero di *Campylobacter* aumenta nei pazienti asintomatici, in studi che coinvolgono un basso numero del batterio-target, in campioni inviati non prontamente al laboratorio e in campioni prelevati nella fase di convalescenza dopo un episodio di diarrea.^{9,10}
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti sono da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti sono diagnostici *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti devono essere usati congiuntamente in accordo al metodo di preparazione indicato. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in piastra, provetta o fialone.
- I terreni in polvere ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Il supplemento selettivo è sterilizzato per filtrazione su membrana.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura, supplemento o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno di base ed il supplemento non utilizzati ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti qui descritti sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Terreno in polvere

Conservare a 2-8°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il fialone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi). L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo del terreno e della definizione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre/provette/fialoni) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

Supplemento selettivo

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta; non utilizzare oltre questa data. Una volta aperto il fialone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Esaminare il prodotto liofilo ed il prodotto ricostituito al momento dell'uso e scartare se vi fossero segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

L'utilizzatore è responsabile del ciclo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia (piastre/provette/fialoni) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).



**16 - BIBLIOGRAFIA**

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. Public Health England. Investigation of Faecal Specimens for Enteric Pathogens. ID30. Issue 8.1. 2014
3. 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.
4. Karmali, M.A., Simor, A.E., Roscoe, M., Fleming, P.C., Smith, S.S., Lane, J. (1986) J. Clin. Microbiol. 21, 456-59
5. 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.
6. Public Health England. Identification of Campylobacter species. ID23. Issue 3.1. 2018
7. Varoli, O., Gatti M. (1989) Personal communication.
8. Endtz HP, Ruijs GJ, et al. Comparison of six media including a semisolid agar for the isolation of various Campylobacter species from stool specimens. J Clin Microbiol 1991; 29:1007
9. Bolton FJ, Robertson L. A selective medium for isolating Campylobacter jejuni/coli. J Clin Pathol 1982; 35:462
10. Hutchinson DN, Bolton FJ. Is enrichment culture necessary for the isolation of Campylobacter jejuni from faeces? J Clin Pathol 1983; 36:1350-1352

KARMALI ANTIMICROBIC SUPPLEMENT 4240035

SDS rev 5

Regolamento (UE) 2020/878

Contiene: cefoperazone, vancomicina HCl**Classificazione**

Sensibilizzazione respiratoria, categoria 1

H334

Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1

H317

Può provocare una reazione allergica cutanea.

Etichettatura

Pittogramma



Avvertenza Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H334

Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

H317

Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261

Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280

Indossare guanti protettivi.

P342+P311

In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI / un medico / . . .

P304+P340

IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.

P333+P313

In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362+P364

Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF or REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Lato superiore	Proteggere dalla luce e dall'umidità
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Proteggere dalla luce	Fragile, maneggi man con cura

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del layout	09/2020
Revisione 7	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità", simbologia di pericolo	04/2022
Revisione 8	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

