



TERRENO PRESTON: **CAMPYLOBACTER BLOOD AGAR BASE** **PRESTON ANTIMICROBIC SUPPLEMENT**

Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo



Campylobacter jejuni
su piastra di terreno Preston

1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno di base e supplemento selettivo per l'isolamento di *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*.

2 - COMPOSIZIONE

CAMPYLOBACTER BLOOD AGAR BASE

FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

Estratto di carne	10,0 g
Peptone	10,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Agar	15,0 g

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

PRESTON ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

CONTENUTO DEL FLACONE PER 500 mL DI TERRENO

Cicloeximide	50 mg
Rifampicina	5 mg
Trimetoprim	5 mg
Polimixina B	2.500 U.I.

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". Provoca una tossinfezione alimentare (campilobatteriosi), tra le più frequenti in Europa, caratterizzata da diarrea con o senza sangue nelle feci, dolori addominali, febbre, cefalea, nausea e vomito; manifestazioni più gravi della malattia si verificano in meno dell'1% dei pazienti, solitamente in soggetti molto anziani o molto giovani, e includono meningiti, endocarditi, aborti settici e la sindrome di Guillain-Barré. È trasmissibile attraverso il consumo di derrate alimentari contaminate, in particolar modo carni crude non trattate, di acqua o latte contaminati. La maggior parte delle infezioni (circa il 90%) 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 Atabay¹ cita i terreni Skirrow, Blaser Wang, Preston, mCCD Bolton, mCCD Hutchinson e Bolton, Karmali, Line TTC.

Il terreno "Preston", è preparato in accordo alla formulazione descritta da Bolton e Robertson² ed è costituito dal terreno di base *Campylobacter Blood Agar Base* a cui deve essere addizionato il supplemento selettivo *Preston Antimicrobial Supplement* e sangue lisato di cavallo. *Campylobacter Blood Agar Base* è essenzialmente un Nutrient Broth n°2 addizionato di agar ed è stato scelto da Bolton e Robertson per il suo basso contenuto in inibitori del trimetoprim.²

In uno studio comparativo³ tra i terreni Skirrow, Butzler, Blaser Wang, Campy-BAP e Preston, volto a valutare le loro prestazioni nell'isolamento di *Campylobacter* spp. da campioni di origine umana, animale ed ambientale, il terreno Preston è risultato il più selettivo ed il più performante in termini di tasso di isolamento, soprattutto dopo arricchimento dei campioni in Preston Broth.

Sulla base dei risultati di Bolton^{2,3}, il terreno Preston è indicato per l'isolamento di *C. jejuni* e *C. coli*, dalle feci di origine umana, da campioni ambientali, animali e dal pollame.

Nell'esame delle feci l'arricchimento non si rende necessario per campioni raccolti in fase di campilobatteriosi acuta mentre aumenta il recupero di *Campylobacter* nei pazienti asintomatici, negli studi nei quali sono coinvolti bassi numeri del batterio target, nei campioni inviati non prontamente in laboratorio e nei campioni prelevati nella fase di convalescenza dopo un episodio di diarrea.^{2,4}

Il terreno Preston può essere utilizzato come secondo terreno di semina nella procedura descritta dalla norma ISO 10272-1⁵, per la determinazione di *Campylobacter* negli alimenti, avendo una miscela di antibiotici che sopprime la crescita della microflora contaminante resistente ai beta lattami di terza generazione, non inibita dal terreno di prima scelta mCCDA Bolton.

L'estratto di carne ed il peptone forniscono azoto, carbonio ed oligolementi necessari alla crescita microbica; il sodio cloruro mantiene l'equilibrio osmotico del terreno; il sangue lisato di cavallo ha la funzione di neutralizzare gli antagonisti del trimetoprim che possono essere presenti come residui nei peptoni¹. Gli antimicrobici del supplemento selettivo hanno le seguenti proprietà: la polimixina è un antibiotico attivo sui batteri Gram positivi, il trimetoprim inibisce soprattutto la crescita di *Proteus* spp., la rifampicina ha una attività inibitoria sui Gram positivi e sui Gram negativi ma non su *Campylobacter*, la cicloeximide è inclusa nella formulazione come antifungino.¹

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 20 g in 475 mL di acqua purificata fredda e portare ad ebollizione sotto agitazione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed aggiungere, con le cautele dell'asepsi, il contenuto di un flacone di *Preston Antimicrobial Supplement* (REF 4240017) e 25 mL di sangue lisato di cavallo (REF 90HLX100). Mescolare bene e distribuire in piastre sterili.

5 - CARATTERISTICHE FISICHE

Campylobacter Blood Agar Base

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, gialla

Aspetto del terreno in soluzione

limpido di colore giallo



Aspetto del terreno in piastra	limpido di colore rosso-viola
pH (20-25°C)	7,5 ± 0,2
Preston Antimicrobial Supplement	
Aspetto della liofila	pastiglia bassa, rosso-mattone
Aspetto del supplemento dopo ricostituzione	soluzione rossa limpida

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Campylobacter Blood Agar Base	Terreno di coltura in polvere	4012852	500 g (12,5 L)
Preston Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilizzato	4240017	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, materiali per l'incubazione in condizioni microaerobiche, reagenti, sangue lisato di cavallo e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni. Campioni alimentari ed ambientali: fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili.⁵

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente.

Campioni della filiera alimentare⁶: determinazione di *Campylobacter* spp. con arricchimento, in campioni con un basso numero di campylobacter e un basso livello di microflora contaminante e/o con campylobacter stressati, ad es. prodotti cotti o congelati,

- Mescolare 10 g o 10 mL di campione con 90 mL di brodo selettivo d'arricchimento (Bolton Broth)*, in modo da ottenere una diluizione 1:10 ed omogeneizzare.
- Incubare la sospensione iniziale in atmosfera microaerobica a 37±1°C per 4 h a 6 h, quindi a 41,5± 1°C per 44 h ± 4 h.
- Con un'ansa sterile inoculare 10 µL di brodo-coltura su piastra di terreno mCCD agar** e su una piastra di un secondo terreno a scelta dell'utilizzatore (es. Preston Medium)***
- Incubate le piastre a 41,5 ± 1°C in condizioni di microaerofilia per 44 ± 4 h e quindi osservare per la presenza di colonie tipiche.

Note

* Bolton Broth: Campylobacter Bolton Enrichment Broth Base, REF 401286B, addizionato di Bolton Broth Selective Supplement REF 4240025 e di sangue lisato di cavallo REF REF 90HLX100.

** mCCD Agar: Campylobacter Blood Free Medium Base (mCCDA), REF 4012822, addizionato di CCDA Antimicrobial Supplement, REF 4240020.

*** L'uso di un secondo terreno con agenti selettivi diversi da quelli nell'agar mCCD potrebbe migliorare il rilevamento di *Campylobacter*, in particolare in presenza di una flora di fondo resistente ai β-lattamici di terza generazione come il cefoperazone.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Le colonie di *Campylobacter* sui terreni d'isolamento in piastra sono di norma piatte, umide, leggermente sciamanti e traslucide anche se possono essere presenti altre tipologie morfologiche. Il riconoscimento delle colonie di *Campylobacter* è legato in gran parte all'esperienza del microbiologo poiché il loro aspetto può variare leggermente, non solo da ceppo a ceppo, ma anche da terreno a terreno e da lotto a lotto del terreno di coltura selettivo utilizzato.⁵

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

L'identificazione presuntiva dei campylobacter termofili ed enteropatogeni può essere effettuata sulla base del test ossidasi (+), l'assenza di crescita con un'incubazione a 25°C e la caratteristica morfologia/motilità microscopica (bacilli curvi con una mobilità a spirale "cavatappi").

Per una esposizione completa dei criteri e dei metodi di identificazione si rimanda alla letteratura citata.^{5,6}

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
<i>P.mirabilis</i> ATCC 29906	39-42°C / 40-48 h / M	crescita inibita

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

12 - VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di *Campylobacter* Agar Base e di Preston Antimicrobial Supplement, usati congiuntamente, vengono testati per saggiare la loro capacità di promuovere la crescita dei ceppi target con appropriate diluizioni in soluzione salina di sospensioni di colonie di *C.jejuni* ATCC 33291 e *C.coli* ATCC 43478, con metodo quantitativo avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato. Dopo incubazione microaerobica vengono contate le colonie sviluppate sul lotto in esame e sul lotto di riferimento e calcolato l'indice di produttività ($Pr=CFU_{TB}/CFU_{RB}$). Nel caso tale indice sia superiore a 0,7 i risultati sono giudicati conformi. Per valutare la selettività del terreno *Campylobacter* Agar Base addizionato di Preston Antimicrobial Supplement vengono seminate con metodo Miles Misra modificato appropriate diluizioni di brodocolture di ceppi non target: un Gram positivo (*S.aureus* ATCC 25923), due Gram negativi (*E.coli* ATCC 25922, *P.mirabilis* ATCC 29906) un lievito (*C.albicans* ATCC 18804). Dopo incubazione a 42°C





per 48 ore in aerobiosi viene valutata la più alta diluizione con crescita microbica: *S.aureus*, *E.coli* e *P.mirabilis* sono completamente inibiti. *C.albicans* risulta parzialmente inibito.

13 - LIMITI DEL METODO

- Con incubazione a 42-43°C alcuni ceppi di *C.fetus*, *C.upsaliensis* *C.jejuni* subsp.*doylei* possono non crescere sul terreno.¹
- La morfologia delle colonie può dipendere dalle condizioni di umidità del terreno: più il terreno è secco più le colonie sono piccole, più il terreno è umido più le colonie si sviluppano in modo tipico.¹
- Usare se possibile le piastre il giorno della loro preparazione. Se necessario, conservare le piastre preparate in laboratorio per non più di 5 giorni al buio a 2-8°C. L'eccessivo essiccamento delle piastre può portare ad errori diagnostici.¹
- Incubazioni prolungate oltre le 48 ore possono dare luogo a sviluppo di contaminanti che mascherano la crescita di *Campylobacter*.³
- Per ottenere l'ottimale recupero di *Campylobacter* da campioni di feci o alimenti, è raccomandabile usare una combinazione di terreni selettivi che include terreno Preston e un secondo terreno, basato su un diverso sistema selettivo, sembra essere il metodo ottimale (ad es. mCCDA).^{5,10}
- 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.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti sono per controlli microbiologici e per uso professionale; 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.
- 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.
- 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.
- Sebbene la destinazione d'uso e la procedura di analisi del terreno di coltura si riferiscano alla rilevazione di *Campylobacter* negli alimenti e quindi il prodotto non debba essere considerato un diagnostico *in vitro*, la letteratura riporta l'uso del terreno di coltura per campioni clinici umani. Le applicazioni cliniche devono essere validate dall'utilizzatore.
- 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 +10°C /+30°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 flacone 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).

Supplemento selettivo

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C /+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 flacone 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 processo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (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. Bolton FJ, Robertson L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *J Clin Pathol* 1982; 35:462
3. Bolton FJ, Coates D, Hinchliffe PM, Robertson L. Comparison of selective media for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*. *J Clin Pathol* 1983; 36:78-83.
4. Hutchinson DN, Bolton FJ. Is enrichment culture necessary for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces? *J Clin Pathol* 1983; 36:1350-1352
5. ISO 10272-1:2017: Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection of *Campylobacter* spp.
6. 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.
7. Public Health England. Investigation of Faecal Specimens for Enteric Pathogens. ID30. Issue 8.1. 2014
8. Public Health England. Identification of *Campylobacter* species. ID23. Issue 3.1. 2018
9. Hunt JM, Abeyta C, Tran T. *In* U.S. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 7 *Campylobacter*. January 2001. Content current as of: 03/26/2018.





10. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
11. 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

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF or REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Fabbricante	 Utilizzare entro	 Proteggere dall'umidità	
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Lato superiore	 Proteggere dalla luce	 Fragile, maneggiare con cura

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	09/2020
Revisione 4	Modifiche a: "destinazione d'uso", "procedura dell'analisi", "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	05/2022
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto	11/2023

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

