



CAMPYLOBACTER ENRICHMENT BROTH BASE PRESTON ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno liquido e supplemento selettivo per l'arricchimento di *Campylobacter* spp. in campioni alimentari.

2 – COMPOSIZIONE

CAMPYLOBACTER ENRICHMENT BROTH BASE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO DISCIOGLIMENTO IN ACQUA *

Peptone	10 g
Estratto di carne	10 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	1 g

PRESTON ANTIMICROBIC SUPPLEMENT (CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML)

Cicloeximide	50 mg
Rifampicina	5 mg
Trimethoprim	5 mg
Polimixina B	2500 IU

* Le formule possono essere adattate e/o integrate per soddisfare i criteri di prestazione richiesti.

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Campylobacter Enrichment Broth Base con l'aggiunta di Preston Antimicrobial Supplement e sangue lisato di cavallo, corrisponde al terreno proposto dal Rapporto ISTISAN 86-95¹ per favorire il recupero di campylobacter danneggiati a livello subletale. Il terreno rappresenta una modifica della formula originale descritta da Bolton e Robertson² e raccomandata dalla norma ISO 179953, poiché contiene 1 g/L di agar. Il peptone e l'estratto di carne forniscono azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita microbica. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. L'agar, incluso in una concentrazione dello 0,1%, favorisce l'inizio della crescita dei *Campylobacter* e ne consente la crescita a partire da inoculi bassi; inoltre, ritarda la dispersione di CO₂, la diffusione di ossigeno e di sostanze riducenti. Gli agenti selettivi del terreno di coltura sono la polimixina B, attiva contro i batteri Gram-negativi, il trimetoprim che sopprime principalmente la crescita di *Proteus* spp. e di altri batteri Gram-negativi, la rifampicina attiva contro i batteri Gram-negativi e Gram-positivi e la cicloeximide, inclusa come composto antimicrobico. Il sangue lisato di cavallo fornisce fattori nutrizionali specifici ed essenziali per la crescita dei campylobacter.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 13 g in 500 mL di acqua depurata; riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Raffreddare a 47-50°C e aggiungere il contenuto di una fiala di Preston Antimicrobial Supplement (REF 42540017) ricostituito con 2 mL di acetone al 50%/acqua purificata sterile e 25 mL di sangue lisato di cavallo (REF 90HLX100). Mescolare bene e distribuire in provette o flaconi sterili in condizioni asettiche.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Campylobacter Enrichment Broth Base

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione	Limpido, giallo chiaro
Aspetto della soluzione in provetta	Limpido, rosso scuro
pH (20-25 °C)	7,5 ± 0,2

Preston Antimicrobial Supplement

Aspetto del liofilo	pastiglia bassa rosso-marrone
Aspetto del supplemento ricostituito	soluzione limpida rossa

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Campylobacter Enrichment Broth Base	Terreno in polvere	4012862	500 g (19,2 L)
Preston Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilo	4240017	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, provette sterili, generatori di atmosfera controllata e giare, sangue lisato di cavallo (REF90HLX100), terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Campioni alimentari. Fare riferimento agli standard internazionali applicabili per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni e operare in conformità alle buone pratiche di laboratorio.



9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

1. In generale, per preparare la sospensione iniziale, aggiungere 25 g o 25 mL della porzione in esame con 225 mL di terreno di arricchimento, in modo da ottenere una diluizione di 1 su 10 e omogeneizzare.
2. Incubare la sospensione iniziale in atmosfera microaerofila a 42 °C per 18 ore.
3. Posizionare una pipetta a circa 2 cm sotto il menisco del brodo e prelevare un'aliquota.
4. Seminare 3-5 gocce sulla superficie di una piastra di terreno Skirrow e di un secondo terreno selettivo come Karmali o CCDA Bolton.
5. Strisciare le gocce sull'intera superficie dell'agar per ottenere colonie ben isolate e incubare a 42°C per 24-48 ore in atmosfera microaerofila.
6. Selezionare 5 colonie tipiche dai terreni selettivi e procedere ai test di conferma.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La crescita microbica nel brodo di arricchimento selettivo è evidenziata dallo sviluppo di torbidità.

Dopo l'incubazione dei terreni di isolamento, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie.

Le colonie di *Campylobacter* sospette vengono esaminate al microscopio per la morfologia e la motilità e riseminate su un agar sangue non selettivo, quindi confermate mediante la rilevazione di ossidasi e catalasi, un test di crescita aerobica a 25°C, acidi e gas in Triple Sugar Iron Agar (TSI), test con dischi di cefalotina. Facoltativamente, le specie di *Campylobacter* sono identificate mediante test biochimici specifici e/o metodi molecolari.

I criteri per l'identificazione dei *Campylobacter* termofili e per la differenziazione tra le specie sono indicati nelle tabelle seguenti.

Caratteristiche principali dei *Campylobacter* termofili

Morfologia cellulare	Piccoli e sottili bastoncini Gram-negativi, ricurvi, con una o più spirali
Mobilità	mobilità tipica
Crescita at 25°C	negativa
Ossidasi	positivo
Catalasi	positivo
Acidi/gas in TSI	negativi
Cefalotina	resistente

Test differenziali per *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*

Test	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
H ₂ S in TSI	-	-	-
Acido Nalidissico	S	S	R
Idrosili dell'ippurato	+	-	-

S = sensibile R = resistente

11 – CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

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, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo qualità:

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. jejuni</i> 33291+ <i>E. coli</i> 25922+ <i>P. mirabilis</i> 29906	42°C 18 h / M	> 10 colonie caratteristiche su CCD agar
<i>C. coli</i> 43478+ <i>E. coli</i> 25922+ <i>P. mirabilis</i> 29906	42°C 18 h / M	> 10 colonie caratteristiche su CCD agar
<i>E. coli</i> ATCC 25922	42°C 18 h / M	nessuna crescita dopo trapianto su Tryptic Soy Agar
<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906	42°C 18 h / M	nessuna crescita dopo trapianto su Tryptic Soy Agar

M: incubazione in microaerifilia; 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 *Campylobacter* Enrichment Broth Base, addizionato di Preston Antimicrobial Supplement (REF 4240017) e sangue lisato di cavallo, vengono valutati per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

La produttività e la selettività sono valutate anche con miscele di ceppi target e non target nelle stesse provette di brodo Preston:

- 1) *C. jejuni* ATCC 33291+*E. coli* ATCC 25922+*P. mirabilis* ATCC 29906
- 2) *C. coli* ATCC 43478+*E. coli* ATCC 25922+*P. mirabilis* ATCC 29906.

Dopo l'incubazione delle provette a 37°C per 18 ore in atmosfera microaerofila e la subcoltura su piastre di mCCDA Agar, i ceppi di *Campylobacter* mostrano una buona crescita (>10 UFC/piastra).

La produttività viene testata con un test semiquantitativo con i ceppi target *C. coli* ATCC 29428 e *C. jejuni* ATCC 33291. Le provette di brodo Preston vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina dei ceppi in esame e incubate a 42°C per 18 ore in atmosfera microaerofila. Dopo l'incubazione, la crescita nel brodo di arricchimento viene inoculata su piastre di mCCD Agar. I ceppi target mostrano una buona crescita su mCCD Agar (> 10 CFU).

La selettività viene valutata mediante un test semiquantitativo con i ceppi non target *E. coli* ATCC 25922 e *P. mirabilis* ATCC 29906. Le provette di brodo Preston vengono inoculate secondo la norma ISO 11133⁴ e incubate a 37°C per 18 ore in atmosfera microaerofila. Dopo l'incubazione, la crescita nel brodo di arricchimento viene inoculata su piastre di Tryptic Soy Agar. I ceppi non target non mostrano crescita su Tryptic Soy Agar.



13 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti sono destinati al controllo microbiologico e sono 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 devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Preston Antimicrobial Supplement è classificato come pericoloso secondo la normativa vigente. 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.
- Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione a membrana.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- L'area del laboratorio deve essere controllata per evitare contaminazioni con il terreno in polvere, i supplementi o i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego dei prodotti, 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.

14 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. 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 (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Supplemento liofilizzato

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

Secondo la norma ISO 17995³, il brodo Preston completo può essere conservato a 5 ± 3°C per non più di 7 giorni.

15- BIBLIOGRAFIA

- Istituto Superiore di Sanità -Metodi di analisi per il controllo microbiologico degli alimenti – Raccolta a cura di D.De Medici, L.Feniccia, L.Orefice, A.Stacchini 1996, iv, 166 p. Rapporti ISTISAN 96/35
- Bolton FJ, Robertson L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. J Clin Pathol 1982 Apr; 35(4):462-7.
- ISO 17995:2019 Water quality — Detection and enumeration of the thermotolerant *Campylobacter* spp
- ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del layout	2023/01

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

