

NUTRIENT BROTH N° 2 PRESTON ANTIMICROBIC SUPPLEMENTS CAMPYLOBACTER GROWTH SUPPLEMENT (Preston broth)

Terreno di coltura in polvere e supplementi

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno liquido di uso generale per la coltivazione di microrganismi esigenti e non esigenti; terreno di base per la preparazione del brodo Preston per l'arricchimento di *Campylobacter* spp. in campioni di cibo e acqua.

2 – COMPOSIZIONE

NUTRIENT BROTH N° 2, TERRENO DISIDRATATO (REF 401812)

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO DISCIOGLIMENTO IN ACQUA *

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

PRESTON ANTIMICROBIC SUPPLEMENT II (REF 4240022)

(CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 MLDI TERRENO)

Polimixina B	2500 IU
Anfotericina	5 mg
Rifampicina	5 mg
Trimetoprim	5 mg

PRESTON ANTIMICROBIC SUPPLEMENT (REF 4240017)

(CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 MLDI TERRENO)

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

CAMPYLOBACTER GROWTH SUPPLEMENT (REF 4240021)

(CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 MLDI TERRENO)

Sodio piruvato	125 mg
Sodio metabisolfito	125 mg
Solfato ferroso	125 mg

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il brodo di Preston, preparato con Nutrient Broth n° 2 e l'aggiunta di Preston Antimicrobic Supplement, Campylobacter Growth Supplement e sangue lisato di cavallo, corrisponde al terreno proposto da Bolton *et al.* nel 1982^{1,2} per la stima di piccole cariche di *Campylobacter* nell'acqua.

L'attuale metodo descritto dalla norma ISO 10272-2³ per i campioni della catena alimentare raccomanda Bolton Broth e Preston Broth, con o senza Campylobacter Growth Supplement e con cicloeximide sostituita da anfotericina B. Preston broth è raccomandato come terreno di arricchimento selettivo per i campioni con un basso numero di *Campylobacter* e un alto livello di microflora di fondo (procedura di rilevamento ISO B). Esiste un metodo ISO simile per l'acqua (ISO17995)⁴ che utilizza il brodo Preston (con supplemento di crescita per *Campylobacter*) e il brodo Bolton.

Alcuni ceppi non crescono senza l'aggiunta al brodo di Preston del growth supplement, inoltre, tale supplemento migliora il recupero di *Campylobacter* spp.³

L'uso del brodo Preston supera i problemi legati alla flora di fondo resistente ai β -lattamici di terza generazione, come il cefoperazone nel brodo Bolton.

L'estratto di carne e il peptone forniscono azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita microbica. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. Il piruvato di sodio favorisce la rivitalizzazione delle cellule stressate e, insieme al metabisolfito di sodio e al solfato di sodio, migliora l'isolamento e la tolleranza all'ossigeno di *Campylobacter* spp.⁵ Il sangue lisato di cavallo fornisce fattori nutrizionali specifici ed essenziali per la crescita dei campylobacter. 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 l'amfotericina B, inclusa come composto antimicotico.

Il Nutrient Broth N°2, senza l'aggiunta di supplementi, può essere utilizzato come terreno liquido di uso generale per la coltivazione di microrganismi esigenti e non esigenti. Fornisce una buona crescita da piccoli inoculi ed è particolarmente adatto per la subcultura di stafilococchi per il test della coagulasi.

4 – PREPARAZIONE

Terreno per uso generale

Sospendere 25 g in 1000 mL di acqua purificata. Mescolare accuratamente e riscaldare leggermente, se necessario, per sciogliere completamente la polvere. Distribuire e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Preston broth



Sospendere 25 g in 945 mL di acqua depurata. Mescolare accuratamente e riscaldare leggermente, se necessario, per sciogliere completamente la polvere. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Raffreddare a 47-50°C e aggiungere 50 mL di sangue lisato di cavallo (REF 90HLX100) e il contenuto di due fiale di Preston Antimicrobial Supplement II (REF 4240022 con amfotericina B) o Preston Antimicrobial Supplement (REF 4240017 con cicloeximide) ricostituite con 2 mL di acetone al 50% in acqua distillata sterile. Se necessario, aggiungere anche il contenuto di 2 fiale di Campylobacter Growth Supplement (REF 4240021), ricostituito con 5 mL di acqua depurata sterile. Mescolare bene e distribuire in provette o flaconi sterili.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Nutrient Broth n°2

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in provetta e in flacone	giallo chiaro, limpido
Aspetto del terreno in provetta	rosso scuro, limpido
pH (20-25 °C)	7,4 ± 0,2

Preston Antimicrobial Supplement (con cicloeximide)

Aspetto del supplemento liofilizzato	compressa bassa di colore rosso-marrone
Aspetto del supplemento ricostituito	soluzione limpida di colore rosso

Preston Antimicrobial Supplement II (con amfotericina B)

Aspetto del supplemento liofilizzato	compressa bassa di colore rosso-marrone
Aspetto del supplemento ricostituito	soluzione opalescente di colore rosso-arancio

Campylobacter Growth Supplement

Aspetto del supplemento liofilizzato	compressa bassa e fragile di colore grigio-verde
Aspetto del supplemento ricostituito	soluzione limpida di colore grigio-verde

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Nutrient Broth n° 2	Terreno in polvere	4018122	500 g (20 L)
Preston Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilo	4240017	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Preston Antimicrobial Supplement II	Supplemento liofilo	4240022	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Campylobacter Growth Supplement	Supplemento liofilo	4240021	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

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

8 – CAMPIONI

Acqua, alimenti, mangimi, campioni ambientali nel settore della produzione e della manipolazione degli alimenti. Fare riferimento agli standard internazionali applicabili^{3,4} per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni e operare in conformità alle buone pratiche di laboratorio.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Campioni alimentari

- Secondo la norma ISO 10272-1, il brodo di Preston è utilizzato come brodo di arricchimento selettivo per l'individuazione di *Campylobacter* in campioni con un basso numero di campylobacter e un alto livello di microflora di fondo, ad esempio carni crude (compreso il pollame) o latte crudo.
- In generale, per preparare la sospensione iniziale, combinare una quantità di 10 g o 10 mL della porzione da analizzare con 90 mL di terreno di arricchimento (brodo di Preston), in modo da ottenere una diluizione 1 su 10, e omogeneizzare.
- Incubare la sospensione iniziale in atmosfera microaerobica a 41,5 ± 1 °C per 24 ore ± 2 ore.
- Utilizzando la coltura ottenuta nel terreno di arricchimento, inoculare con un'ansa sterile da 10 µl la superficie del terreno di isolamento, mCCDA Agar*.
- Incubare il terreno solido selettivo a 41,5 °C in atmosfera microaerobica ed esaminare dopo 44 ± 4 h per rilevare la presenza di colonie di *Campylobacter* tipiche e/o sospette.

Campioni di acque

- In generale, l'individuazione di *Campylobacter* nell'acqua secondo la norma ISO 17995⁴ richiede un arricchimento seguito dall'isolamento delle colonie e dalla loro conferma.
- I campioni vengono inoculati direttamente o dopo la concentrazione mediante filtrazione su membrana in uno dei due brodi di arricchimento selettivi a seconda del livello previsto di microrganismi di fondo: Bolton Broth^A per le acque pulite e Preston broth per le acque fortemente contaminate. Per la rilevazione del *Campylobacter* viene trattato un singolo volume di campione e, se necessario, per una determinazione semiquantitativa vengono utilizzati almeno tre volumi di 10 volte (ad esempio 10 mL, 100 mL e 1000 mL). Per la determinazione quantitativa (MPN), si utilizzano volumi di 500 mL, 5 x 100 mL, 5 x 10 mL e, nei casi in cui i conteggi possono essere elevati, volumi più piccoli o si diluisce il campione iniziale. I brodi inoculati vengono poi incubati in microaerobiosi a 37 ± 1 °C per 44 ± 4 h.
- Dalle colture di brodo di arricchimento, i terreni liquidi selettivi vengono inoculati su mCCDA agar* e le piastre vengono incubate a 41,5 ± 1 °C per 44 ± 4 h in atmosfera microaerobica.

Note

*mCCDA agar: Campylobacter Blood Free Medium Base Bolton REF 401282 + Bolton CCDA Antimicrobial Supplement REF 4240020

^ABrodo Bolton: Campylobacter Bolton Broth Base REF 401286B2 + Bolton Broth Selective Supplement REF 4240025.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La crescita microbica nel brodo di Preston 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* sono generalmente grigiastre su mCCDA Agar, spesso con una lucentezza metallica, e sono piatte e umide, con una tendenza a diffondersi. Le colonie tendono a diffondersi meno su superfici di agar più asciutte. Possono osservarsi altre forme di colonie.



Le colonie di *Campylobacter* sospette vengono esaminate al microscopio per verificarne la morfologia e la motilità e subcoltivate su un agar sangue non selettivo, per poi essere confermate dal rilevamento dell'attività ossidativa e da un test di crescita aerobica a 25°C.

Caratteristiche del *Campylobacter*

Morfologia: piccoli bacilli ricurvi, motilità, caratteristica forma a cavatappi, crescita aerobica a 25°C: negativa, test dell'ossidasi: positivo
C. coli, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. upsaliensis* possono essere differenziati mediante il test della catalasi, l'idrolisi dell'ippurato e il test dell'indoxil acetato.

In alternativa o in aggiunta ai test di conferma e di identificazione, possono essere utilizzati altri test come la PCR, i metodi sierologici, l'analisi MALDI-TOF-MS.

Per una spiegazione completa dei criteri e dei metodi di identificazione, consultare i riferimenti citati.^{3,4}

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 utili per il controllo qualità.⁵ A seconda dell'uso previsto (ad esempio, rilevamento di *Campylobacter* nell'acqua o negli alimenti), applicare il controllo di qualità richiesto dagli standard.^{3,4,8}

12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Nutrient Broth n° 2 disidratato, addizionato a Preston Antimicrobic Supplement (REF 4240017) e sangue lisato di cavallo, viene testato per la produttività e la selettività confrontando i risultati con i lotti di riferimento precedentemente approvati.

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

1) *C. jejuni* ATCC 29248 + *E. coli* ATCC 25922 + *S. aureus* ATCC 6538.

2) *C. coli* ATCC 43478 + *E. coli* ATCC 25922 + *S. aureus* ATCC 6538.

Dopo l'incubazione delle provette a 41,5°C per 24 ± 2h in atmosfera microaerobica 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 33291. Le provette di brodo Preston vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina dei ceppi in esame e incubate a 41,5°C per 24 ± 2h in atmosfera microaerobica. Dopo l'incubazione, la crescita sul brodo di arricchimento viene trapiantata su piastre di mCCDA Agar. I ceppi target mostrano una buona crescita su mCCDA Agar (> 10 UFC).

La selettività viene valutata mediante un test semiquantitativo con i ceppi non target *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923. Le provette di brodo Preston vengono incubate a 41,5°C per 24 ± 2h in atmosfera microaerobica. Dopo l'incubazione, la crescita sul brodo di arricchimento viene trapiantata su piastre di Tryptic Soy Agar. I ceppi non target non presentano crescita su Tryptic Soy Agar.

13 – LIMITI DEL METODO

- Le procedure sopra descritte sono rivolte ai *Campylobacter* spp. termotolleranti rilevanti per la salute umana. I ceppi più frequentemente riscontrati sono *C. jejuni* e *C. coli*. Tuttavia, sono state descritte altre specie (*C. lari*, *C. upsaliensis* e altre).³
- Il riconoscimento delle colonie di *Campylobacter* è in gran parte una questione di esperienza e il loro aspetto può variare leggermente.³

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di base e i supplementi 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 i supplementi 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 Antimicrobic Supplement e Preston Antimicrobic Supplement II sono classificati come pericolosi 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.
- I supplementi sono sterilizzati mediante filtrazione su membrana.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura in polvere, i supplementi ed 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.

15 – 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 le norme ISO 10272³ e ISO 17995⁴, il brodo Preston completo deve essere conservato a 5 ± 3°C per non più di 7 giorni.

16- BIBLIOGRAFIA

1. Bolton FJ, Hinchliffe PM, Coates D, Robertson L. A most probable number method for estimating small numbers of campylobacters in water. J Hyg (Lond). 1982 Oct; 89(2):185-90.
2. Bolton FJ, Robertson L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. J Clin Pathol 1982; 35(4):462-7.
3. ISO 10272-1:2017+ A1: 2023. Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method.
4. ISO 17995:2019 Water quality — Detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp.
5. Hoffman PS, George HA, Krieg NR, Smibert RM. Studies of the microaerophilic nature of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. II. Role of exogenous superoxide anions and hydrogen peroxide. Can J Microbiol 1979 Jan; 25(1):8-16.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT 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 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2023

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

