



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

Terreno di coltura in polvere, terreno pronto all'uso in piastre e supplemento selettivo

1 - DESTINAZIONE D'USO

Per la ricerca di *Campylobacter* spp. negli alimenti e in altri campioni.

2 – COMPOSIZIONE***FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA****CAMPYLOBACTER BLOOD FREE MEDIUM BASE BOLTON**

Estratto di manzo	10,00 g
Peptone	10,00 g
Triptone	3,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Carbone	4,00 g
Sodio desossicolato	1,00 g
Ferro solfato	0,25 g
Sodio piruvato	0,25 g
Agar	15,50 g

BOLTON CCDA ANTIMICROBIC SUPPLEMENT**CONTENUTO DEL FLACONE PER 500ML DI TERRENO**

Cefoperazone	16 mg
Amfotericina B	5 mg

CAMPYLOBACTER BLOOD FREE AGAR (CCDA BOLTON) – PIASTRE PRONTE ALL'USO

Campylobacter Blood Free Medium Base Bolton	49 g
Cefoperazone	32 mg
Anfotericina B	10 mg
Acqua purificata	1000 mL

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Dall'inizio degli anni '70, quando *C. jejuni* e *C. coli* sono stati riconosciuti come agenti di infezioni gastrointestinali associate ad intossicazioni alimentari, sono stati sviluppati diversi terreni di coltura liquidi ed in piastra, originariamente all'esame delle feci e poi estesi alla ricerca di *Campylobacter* negli alimenti e nell'acqua.¹

I terreni selettivi per l'isolamento del *Campylobacter* sono costituiti da una base non selettiva da utilizzare con o senza sangue animale e da una miscela di composti antimicrobici; tra i terreni di isolamento proposti in letteratura, la rassegna di Corry e Atabay¹ cita i seguenti: Skirrow, Blaser Wang, Preston, mCCD Bolton, mCCD Hutchinson e Bolton, Karmali, Line TTC.

Le formulazioni prive di sangue (ad es. mCCDA, Karmali) sembrano avere prestazioni migliori rispetto ai terreni al sangue.²

Campylobacter Blood Free Medium CCDA Bolton è preparato secondo la formulazione proposta da Bolton, Hutchinson e Coates³ e successivamente modificato sostituendo cefazolina con cefoperazone per migliorare le proprietà di selettività.⁴ Il terreno è raccomandato dalla ISO 10272^{5,6} per il rilevamento e la conta di *Campylobacter* spp. in campioni della catena alimentare e dalla ISO 17995⁷ per il rilevamento e la conta di *Campylobacter* spp. termotollerante, nelle acque.

Il terreno è noto anche come "modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCD agar)".

Estratto di manzo, triptone e peptone forniscono azoto, carbonio, vitamine, minerali e aminoacidi per la crescita microbica. Carbone, piruvato di sodio e solfato ferroso, migliorano l'isolamento e la tolleranza all'ossigeno di *Campylobacter* spp. neutralizzando gli anioni superossido ed il perossido di idrogeno che si verificano spontaneamente nel mezzo di coltura⁸, il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. Gli agenti selettivi del terreno sono: il desossicolato di sodio attivo contro i batteri Gram-positivi, il cefoperazone che sopprime principalmente la crescita dei batteri Gram-negativi e l'anfotericina B, inclusa come composto antimicotico.

4 – PREPARAZIONE

Sospendere 24,5 g di Campylobacter Blood Free Medium Base Bolton in 500 mL di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione agitando frequentemente, sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti e raffreddare a 47-50°C. Aggiungere il contenuto di una fiala di Bolton CCDA Antimicrobial Supplement (REF 4240020) ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO**Campylobacter Blood Free Medium Base Bolton**

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, nera
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	nero, opaco
pH (20-25°C)	7,4 ± 0,2

Bolton CCDA Antimicrobial Supplement

Aspetto del supplemento liofilizzato	pastiglia bassa, giallastra
Aspetto della soluzione	paglierino, opalescente



**6 – MATERIALI FORNITI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Campylobacter Blood Free Medium Base Bolton	Terreno di coltura in polvere	4012822	500 g (10.2 L)
Bolton CCDA Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilizzato	4240020	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Campylobacter Blood Free Agar (CCDA Bolton)	Piastre pronte all'uso	541282	2 x 10 piastre ø 90 mm

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e tamponi sterili, incubatrice e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, matracci, piastre Petri sterili, generatori di atmosfera controllata e giare, terreni di coltura ausiliari e reagenti per l'identificazione completa delle colonie.

8 – CAMPIONI

Acqua, alimenti, mangimi per animali, campioni ambientali nell'area della produzione e manipolazione degli alimenti. Fare riferimento agli standard internazionali applicabili⁵⁻⁷ per la raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni e operare secondo le buone pratiche di laboratorio.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Secondo la norma ISO 10272-1, in funzione del tipo di campione e dello scopo del test, possono essere utilizzate tre diverse procedure di rilevamento del *Campylobacter*:

- rilevamento di *Campylobacter* mediante arricchimento, in campioni con basso numero di *Campylobacter* e basso livello di microflora contaminante e/o con *Campylobacter* stressati: arricchimento in brodo Bolton* con incubazione in atmosfera microaerofila a 37°C per 4-6 ore e quindi a 41,5 °C per 44 ore.
- rilevamento di *Campylobacter* per arricchimento, in campioni con basso numero di *Campylobacter* ed alto livello di microflora contaminante: arricchimento in brodo Preston^ con incubazione in atmosfera microaerofila a 41,5 °C per 24 ore.
- rilevamento di *Campylobacter* mediante semina diretta in piastra, in campioni con un numero elevato di *Campylobacter*.

Procedura di rilevamento A: dalla coltura di arricchimento in Bolton Broth, inoculare due terreni solidi selettivi:

- Agar mCCD
- qualsiasi altro terreno selettivo solido per *Campylobacter* che utilizzi un principio selettivo diverso.

Procedura di rilevamento B: dalla coltura di arricchimento in Preston Broth inoculare le piastre di agar mCCDA.

Procedura di rilevamento C: la porzione da analizzare viene piastrata direttamente o dopo averla sospesa in una quantità adeguata di liquido, sulle piastre di agar mCCD.

I terreni solidi selettivi vengono incubati a 41,5 °C in atmosfera microaerofila ed esaminati dopo 44 ore per rilevare la presenza di colonie sospette di *Campylobacter*.

In generale, la rilevazione del *Campylobacter* nelle acque secondo la ISO 17995 richiede l'arricchimento seguito dall'isolamento delle colonie e dalla loro conferma.⁷ I campioni con livelli previsti elevati di contaminazione vengono inoculati direttamente nel brodo Preston; dove il livello atteso di microrganismi contaminanti è basso e i campioni non possono essere processati mediante filtrazione su membrana, è possibile utilizzare il brodo Bolton. Se non sono disponibili informazioni sul livello di contaminazione, devono essere utilizzati entrambi i brodi. I brodi di arricchimento incubati vengono inoculati su piastre mCCDA e incubati a 41,5 ± 1 °C per 44 ± 4 ore.

Note

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

^ Preston broth: Nutrient Broth n° 2 REF 401812S2 + Preston Antimicrobial Supplement REF 4240022 + Sangue di cavallo lisato REF 90HLX100.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie.

Le colonie di *Campylobacter* sono generalmente grigiastre su mCCD Agar, spesso con una lucentezza metallica, e sono piatte e umide, con tendenza a diffondere. Le colonie tendono a diffondere meno sulle superfici dell'agar più asciutte. Possono comunque presentarsi colonie di forme diverse.

Esaminare le colonie sospette di *Campylobacter* per morfologia e motilità utilizzando un microscopio e, dopo aver allestito una subcoltura su agar sangue non selettivo, confermare mediante rilevamento dell'attività dell'ossidasi e un test di crescita in aerobiosi a 25°C. Le specie di *Campylobacter* possono essere identificate mediante specifici test biochimici e/o metodi molecolari.

Per una spiegazione completa dei criteri e delle modalità di identificazione, fare riferimento alla normativa.⁵⁻⁹

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 responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	40.5-42.5°C / 40-48h / M	buona crescita
<i>C. coli</i> ATCC 43478	40.5-42.5°C / 40-48h / M	buona crescita
<i>E. coli</i> ATCC 25922	40.5-42.5°C / 40-48h / M	inibito
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	40.5-42.5°C / 40-48h / M	inibito

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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di Campylobacter Blood Free Medium Base Bolton addizionato con Bolton CCDA Antimicrobial Supplement e le piastre pronte per l'uso, vengono testati per produttività e selettività confrontando i risultati con i Lotti di Riferimento precedentemente approvati.

La produttività viene testata con metodo quantitativo con i ceppi target *C. coli* ATCC 43478 e *C. jejuni* ATCC 33291: le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 42°C per 40-48 ore in atmosfera microaerofila. Le colonie vengono enumerate sul terreno da testare (TB) e su quello di riferimento (RB) e viene calcolato il rapporto di produttività ($Pr = \frac{UFC_{TB}}{UFC_{RB}}$). Se $Pr \geq 0,7$ i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.





La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato inoculando le piastre con gocce di opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione pari a 0,5 McFarland dei ceppi non-target *C. albicans* ATCC 18804, *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 19433. *C. albicans* è parzialmente inibita, la crescita degli altri ceppi non-target è totalmente inibita.

13 – LIMITI DEL METODO

- I contaminanti più numerosi trovati nel terreno agar mCCDA sono le *Enterobacteriaceae*, che sono resistenti al cefoperazone quando presenti in numero elevato, in particolare *Klebsiella oxytoca*.¹
- Anche se le colonie microbiche sulle piastre sono differenziate in base alle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa su isolati, da coltura pura, per una completa identificazione.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti sono da intendersi solo per controlli microbiologici e 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 base e il supplemento devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte.
- I terreni in polvere e i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Bolton CCDA Antimicrobial Supplement è classificato come pericoloso dalla 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Prestare attenzione quando si apre l'anello metallico delle fiale per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione su membrana.
- Ciascuna piastra di questo terreno di coltura è esclusivamente monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti delle specifiche definite riportate sul Certificato di Controllo Qualità.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'area del laboratorio deve essere controllata per evitare contaminazioni con il terreno in polvere, il supplemento o i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno e il supplemento non utilizzato 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 la Scheda di Sicurezza del prodotto 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 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

Piastre pronte all'uso

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 usare oltre la data di scadenza. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

Terreno disidratato

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 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 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).

Secondo la norma ISO 17995², le piastre mCCDA preparate in laboratorio possono essere conservate a 5 ± 3 °C in buste ermetiche, al buio, per non più di 10 giorni, mentre la base può essere conservata in bottiglie ermetiche, al buio, a 5 ± 3 °C per non più di un mese.

16 - BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Fitzgerald C, Nachamkin I. Campylobacter and Arcobacter. In Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.998.
- 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.
- 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
- 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. Karmali, M.A., Simor, A.E., Roscoe, M., Fleming, P.C., Smith, S.S., Lane, J. (1986) J. Clin. Microbiol. 21, 456-59

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	06/2022

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

