



CAMPYLOBACTER BOLTON ENRICHMENT BROTH BASE BOLTON BROTH SELECTIVE SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo

1 – DESTINAZIONE D'USO

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

2 – COMPOSIZIONE

CAMPYLOBACTER BOLTON ENRICHMENT BROTH BASE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO DISCIOGLIMENTO IN ACQUA *

Digerito enzimatico di tessuto animale	10,00 g
Idrolizzato di lattealbumina	5,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Sodio piruvato	0,50 g
Sodio metabisolfito	0,50 g
Sodio carbonato	0,60 g
Acido α -chetoglutarico	1,00 g
Emina	0,01 g

BOLTON BROTH SELECTIVE SUPPLEMENT

(CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML)

Cefoperazone	10 mg
Vancomicina	10 mg
Trimetoprim lattato	10 mg
Anfotericina B	5 mg

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Bolton Broth, preparato con *Campylobacter* Bolton Enrichment Broth Base e l'aggiunta di Bolton Broth Selective Supplement e sangue lisato di cavallo, corrisponde al terreno proposto da Bolton¹ per favorire il recupero dei campylobacter danneggiati a livello subletale.

L'attuale metodo ISO² per gli alimenti in generale raccomanda l'uso del brodo Bolton come terreno di arricchimento selettivo per i campioni con un basso numero di campylobacter e un basso livello di microflora contaminante e/o con campylobacter stressati. Esiste un metodo ISO simile per l'acqua che utilizza il brodo Bolton e il brodo Preston.³ L'arricchimento selettivo in brodo di Bolton è raccomandato anche dalla FDA-BAM.⁴

Il digerito enzimatico di tessuto animale e l'idrolizzato di lattealbumina forniscono azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. Il piruvato di sodio favorisce il recupero delle cellule stressate e, insieme al metabisolfito di sodio e al carbonato di sodio, aumenta tolleranza all'ossigeno di *Campylobacter* spp ed il tasso d'isolamento. L'alfa-chetoglutarato, l'emina e il sangue lisato di cavallo forniscono fattori nutrizionali specifici ed essenziali per la crescita dei campylobacter. Gli agenti selettivi del terreno sono la vancomicina, attiva contro i batteri Gram-positivi, il trimetoprim e il cefoperazone, che sopprimono principalmente la crescita dei batteri Gram-negativi, e l'anfotericina B, inclusa come composto antimicotico.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 13,8 g in 470 mL di acqua purificata; riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47 °C ed aggiungere il contenuto di una fiala di Bolton Broth Selective Supplement (REF 4240025) ricostituito con 5 mL di etanolo al 50%/acqua distillata sterile, insieme a 25 mL di sangue lisato di cavallo (REF 90HLX100). Mescolare bene e distribuire in provette o flaconi sterili.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Campylobacter Bolton Enrichment Broth Base

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in provetta	Limpido, rosso scuro
pH (20-25 °C)	7,4 \pm 0,2

Bolton Broth Selective Supplement

Aspetto del liofilo	pastriglia bassa giallo chiaro
Aspetto della soluzione	giallo, opalescente con la presenza di precipitati

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Campylobacter Bolton Enrichment Broth Base	Terreno in polvere	401286B2	500 g (18.1 L)
Bolton Broth Selective Supplement	Supplemento liofilo	4240025	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, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Acqua, alimenti, mangimi, campioni ambientali nell'area della produzione e della manipolazione degli alimenti. Fare riferimento agli standard internazionali applicabili²⁻⁴ per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni e operare in conformità alle buone pratiche di laboratorio.



9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Campioni alimentari²

Secondo la norma ISO 10272-1, il brodo Bolton viene utilizzato come brodo di arricchimento selettivo per la rilevazione di *Campylobacter* in campioni con un basso numero e un basso livello di microflora di fondo e/o con *Campylobacter* stressati.

In generale, per preparare la sospensione iniziale, mescolare una quantità di 10 g o 10 mL della porzione in esame con 90 mL di brodo Bolton, in modo da ottenere una diluizione 1 a 10, e omogeneizzare.

Incubare in atmosfera microaerofila a 37°C ± 1°C per 4 ore-6 ore, quindi a 41,5°C ± 1°C per 44 ore ± 4 ore.

Utilizzando la coltura ottenuta nel terreno di arricchimento, inoculare con un'ansa sterile da 10 µl la superficie di due terreni di isolamento selettivi: mCCD agar* e un secondo terreno di isolamento selettivo per *Campylobacter* che utilizza un principio selettivo diverso.

Incubare i terreni solidi selettivi a 41,5°C ± 1°C in atmosfera microaerofila ed esaminare dopo 44 ± 4 ore per rilevare la presenza di colonie di *Campylobacter* sospette.

Acque³

In generale, l'individuazione di *Campylobacter* nell'acqua secondo la norma ISO 17995 richiede un arricchimento seguito dall'isolamento delle colonie e dalla loro conferma.

I campioni vengono inoculati direttamente o dopo la concentrazione mediante filtrazione a membrana in uno dei due brodi di arricchimento selettivi, a seconda del livello previsto di microrganismi di fondo: Bolton Broth per le acque pulite e Preston Broth^A per le acque fortemente contaminate. Per la rilevazione di *Campylobacter* viene trattato un singolo volume di campione e, se necessario, per una determinazione semiquantitativa vengono utilizzati almeno tre volumi (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, laddove i conteggi possono essere elevati, volumi più piccoli o diluizioni del campione iniziale. Le brodoculture vengono quindi incubate in microaerofilia a 37 ± 1 °C per 44 ± 4 h. Dalle colture di arricchimento, i terreni selettivi liquidi vengono inoculati su mCCDA* e le piastre mCCDA incubate a 41,5 ± 1 °C per 44 ± 4 h in atmosfera microaerofila.

Note

* mCCDA agar: *Campylobacter* Blood Free Medium Base Bolton REF 401282 + Bolton CCDA Antimicrobial Supplement REF 42400120

^A Brodo di Preston: Nutrient Broth n° 2 REF 401812S2 + Preston Antimicrobial Supplement REF 4240022 + Lysed Horse Blood REF 90HLX100.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La crescita microbica in Bolton Broth 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 mCCD 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 verificarsi altre forme di colonie.

Le colonie di *Campylobacter* sospette vengono esaminate al microscopio per verificarne la morfologia e la motilità e trasferite su un agar sangue non selettivo, quindi confermate mediante il test dell'ossidasi e un test di crescita a 25°C in aerobiosi. Facoltativamente, le specie di *Campylobacter* sono identificate mediante test biochimici specifici e/o metodi molecolari.

Per una spiegazione completa dei criteri e dei metodi di identificazione, si rimanda ai riferimenti citati.²⁻⁴

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 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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. jejuni</i> 33291+ <i>E. coli</i> 25922+ <i>P. mirabilis</i> 29906	37±1°C / 44±4 h / M	> 10 colonie caratteristiche su CCD agar
<i>C. coli</i> 43478+ <i>E. coli</i> 25922+ <i>P. mirabilis</i> 29906	37±1°C / 44±4 h / M	> 10 colonie caratteristiche su CCD agar
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37±1°C / 44±4 h / M	nessuna crescita dopo trapianto su Tryptic Soy Agar
<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906	37±1°C / 44±4 h / M	nessuna crescita dopo trapianto su Tryptic Soy Agar

M: incubazione in microaerofilia; 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* Bolton Enrichment Broth Base, addizionato di Bolton Broth Selective Supplement (TB) vengono valutati per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

La produttività e la selettività sono state testate con miscele di ceppi target e non target nelle stesse provette di Bolton Broth:

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 44 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 Bolton Broth vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina dei ceppi in esame e incubate a 37°C per 44 ore in atmosfera microaerofila. Dopo l'incubazione, la crescita sul brodo di arricchimento viene inoculata su piastre di mCCD Agar. I ceppi target mostrano una buona crescita su mCCD Agar (> 10 UFC).

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 Bolton Broth vengono inoculate secondo la norma ISO 111335 e incubate a 37°C per 44 ore in atmosfera microaerofila. Dopo l'incubazione, la crescita sul 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. Bolton Broth Selective 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 +2°C /+2°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 17995, il terreno di base deve essere conservato a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di sei mesi al buio in flaconi con chiusura ermetica.³

15- BIBLIOGRAFIA

1. Bolton, F. J. Methods for the isolation of campylobacters from humans, food and water. In: The Increasing Incidence of Human Campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts, Copenhagen, Denmark, 21-25 November 2000, pp. 87 – 93
2. ISO 10272-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. — Part 1: Detection method
3. ISO 17995:2019 Water quality — Detection and enumeration of thermotolerant Campylobacter spp
4. FDA-BAM Chapter 7: Campylobacter. Content current as of: 08/03/2021
5. ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del layout	01/2023

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

