

ISTRUZIONI PER L'USO

KARMALI ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

Supplemento selettivo liofilizzato.

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Miscela di antimicrobici da aggiungere a Campylobacter Blood Free Medium Base (Karmali) per l'isolamento di *Campylobacter* spp. da campioni clinici e non-clinici.

2 - COMPOSIZIONE**CONTENUTO DEL FLACONE (PER 500 mL DI TERRENO)**

Cefoperazone	16 mg
Vancomicina	10 mg

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Karmali Antimicrobial Supplement è una miscela liofilizzata di antimicrobici da utilizzare come supplemento del Campylobacter Blood Free Medium Base (Karmali). Il terreno completo Karmali Medium, originariamente ideato da Karmali nel 1986,¹ è un terreno selettivo per l'isolamento di *Campylobacter* spp. termotollerante dalle feci e da altri campioni non clinici.

Gli agenti selettivi del supplemento sono la vancomicina, con una forte attività inibitoria verso i batteri Gram positivi ed il cefoperazone, che sopprime principalmente la crescita dei batteri Gram negativi. La cicloeximide è inclusa come composto antifungino nel terreno di base. Il carbone (in sostituzione del sangue animale), l'ematina ed il piruvato di sodio del terreno di base stimolano la crescita di *Campylobacter*, ne aumentano l'aero-tolleranza e inibiscono i composti tossici che si formano durante la crescita.

4 - METODO DI RICOSTITUZIONE E DI PREPARAZIONE DEL TERRENO

Sciogliere il contenuto di una fiala di Karmali Antimicrobial Supplement con 5 mL di acqua purificata sterile.

Con le precauzioni dell'asepsi, aggiungere a 500 mL di Campylobacter Blood Free Medium Base (Karmali) (REF 401283) sterilizzato in autoclave a 115°C per 15 minuti e raffreddato a 47-50°C. Mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto del liofilizzato	pastiglia bassa, compatta, bianca
Aspetto della soluzione	limpida, incolore

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Karmali Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilizzato	4240035	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Campylobacter Blood Free Medium Base (Karmali) (REF 401283), autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie. Materiali per l'incubazione in atmosfera microaerofila.

8 - CAMPIONI

I campioni fecali sono preferibili per isolare *Campylobacter* spp. da pazienti con infezioni gastrointestinali; tuttavia, sono anche accettabili i tamponi rettali.² Se possibile raccogliere i campioni prima dell'inizio della terapia antibiotica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente.

- Feci solide: le feci possono essere diluite 1: 4 in acqua peptonata 0.1% o in soluzione fisiologica sterile. È stato dimostrato che la diluizione riduce significativamente la quantità di flora contaminante senza compromettere l'isolamento degli agenti patogeni anche se presenti in bassa carica.³ Mescolare bene quindi inoculare sulla piastra 3-5 gocce di sospensione.
- Feci liquide: inoculare 3 gocce sulla superficie della piastra.
- Tampone rettale: rotolare il tampone su una piccola area in prossimità del bordo piastra

Per tutti i campioni comunque strisciare con un'ansa sterile il campione sui 4 quadranti della piastra per ottenere colonie isolate assicurandosi che le sezioni 1 e 4 non si sovrappongano.

Incubare a 39-42°C in atmosfera microaerobica (10% CO₂; 5-6% O₂; 84-85% N₂) per 40-48 ore.²

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Campylobacter jejuni cresce con colonie piccole, mucose, piatte con bordi irregolari. Le colonie tendono a sciamare.

Le specie di *Campylobacter* sono ossidasi positive. Se una colonia che fenotipicamente appare come *Campylobacter* fosse ossidasi negativa, trapiantare su agar sangue e ripetere il test dopo incubazione di 24 ore.⁴

L'identificazione presuntiva dei *Campylobacter* termofili ed enteropatogeni può essere fatta sulla base delle positività al test dell'ossidasi ed alla mobilità caratteristica a fresco.

Per una descrizione completa dei criteri e dei metodi di identificazione, fare riferimento alla bibliografia citata.⁴

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.





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

A: incubazione in aerobiosi; M: incubazione in microaerofilia; A: Aerobiosi; 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 Karmali Antimicrobial Supplement addizionali al terreno in polvere *Campylobacter* Blood Free Medium Base (Karmali) (REF 401283) vengono testati per la produttività e la selettività avendo come riferimento lotti precedentemente approvati e considerati come Lotti di Riferimento.

La produttività è saggiata con metodo quantitativo con i ceppi target *C.coli* ATCC 43478 and *C.jejuni* ATCC 33291. Le piastre di terreno Karmali del lotto in esame (TB) e del lotto di riferimento (RB), sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina di sospensioni delle colonie dei ceppi target. Dopo incubazione a 39-42°C per 40-48 ore in microaerofilia, vengono contate le colonie sviluppate sui due lotti e calcolato l'indice di produttività ($Pr=UFC_{TB}/UFC_{RB}$). Nel caso Pr sia superiore o uguale a 0,7 i risultati sono giudicati conformi.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificate appropriate diluizioni di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non target *C.albicans* ATCC 18804, *E.coli* ATCC 8739, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 19433. Dopo incubazione *C.albicans* risulta parzialmente inibita mentre gli altri ceppi non target sono completamente inibiti.

Le piastre di *Campylobacter* Blood Free Agar (Karmali) preparate come sopra descritto, sono state valutate in una sperimentazione clinica su 198 coproculture avendo come riferimento il terreno CCDA Preston.⁷ In 8 campioni è stato rinvenuto *Campylobacter*. su entrambi i terreni ma, mentre sul terreno Karmali 5 volte è stato ritrovato in coltura pura, sul terreno CCDA Preston è stato ritrovato solo 2 volte. Non sono state trovate differenze significative tra i due terreni per quanto riguarda la crescita della flora microbica contaminante di lieviti e di bacilli Gram negativi; differenze significative, a favore del terreno Karmali, sono state calcolate per quanto riguarda l'inibizione dei batteri Gram positivi.

13 - LIMITI DEL METODO

- I contaminanti che più frequentemente si ritrovano sul terreno sono *Enterobacteriaceae* resistenti al cefoperazone, se presenti in numero elevato, in particolare *Klebsiella oxytoca*.⁶
- Per ottenere i migliori tassi di isolamento di *Campylobacter* dai campioni fecali, è raccomandabile una combinazione di terreni che includa il terreno Karmali e un secondo terreno basato su un diverso sistema selettivo (ad esempio, il terreno Skirrow).⁷
- L'estensione del tempo di incubazione da 48 a 72 ore comporta un aumento delle percentuali di isolamento.⁷
- Le formulazioni prive di sangue (ad es. Karmali, CCDA) sembrano avere prestazioni migliori rispetto ai terreni contenenti sangue.²
- Non vi sono adeguate evidenze sperimentali che dimostrino in maniera univoca il vantaggio clinico dell'uso dei brodi di arricchimento formulati per migliorare il recupero di *Campylobacter*.² L'arricchimento sembra non essere necessario per i campioni raccolti nella fase acuta di campilobatteriosi, mentre il recupero di *Campylobacter* aumenta nei pazienti asintomatici, in studi che coinvolgono un basso numero del batterio-target, in campioni inviati non prontamente al laboratorio e in campioni prelevati nella fase di convalescenza dopo un episodio di diarrea.^{8,9}
- 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 e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti sono da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il supplemento qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Il supplemento qui descritto ed il terreno di base devono essere usati in associazione secondo le indicazioni sopra riportate. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Il supplemento qui descritto è sottoposto a sterilizzazione con membrana filtrante.
- Porre molta attenzione nell'apertura della ghiera metallica per evitare lesioni.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il supplemento, i terreni di coltura e con gli agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione; smaltire il supplemento non utilizzato ed i terreni di coltura seminati con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il supplemento qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano e animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- 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

Dopo il ricevimento, 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 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 della correttezza del ciclo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia (piastre/flaconi) e delle condizioni di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Karmali, M.A., Simor, A.E., Roscoe, M., Fleming, P.C., Smith, S.S., Lane, J. (1986) J. Clin. Microbiol. 21, 456-59
2. Fitzgerard 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.
3. Public Health England. Investigation of Faecal Specimens for Enteric Pathogens. ID30. Issue 8.1. 2014
4. Public Health England. Identification of Campylobacter species. ID23. Issue 3.1. 2018
5. Varoli, O., Gatti M. (1989) Personal communication.
6. 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.
7. 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
8. Bolton FJ, Robertson L. A selective medium for isolating Campylobacter jejuni/coli. J Clin Pathol 1982; 35:462
9. Hutchinson DN, Bolton FJ. Is enrichment culture necessary for the isolation of Campylobacter jejuni from faeces? J Clin Pathol 1983; 36:1350-1352

KARMALI ANTIMICROBIC SUPPLEMENT 4240035

SDS rev. 5

Regolamento (UE) 2020/878

Contiene: Cefoperazone, vancomicina HCl**Classificazione**

Sensibilizzazione respiratoria, categoria 1

H334

Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1

H317

Può provocare una reazione allergica cutanea.

Etichettatura

Pittogramma



Avvertenza Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H334

Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

H317

Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261

Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280

Indossare guanti protettivi.

P342+P311

In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI / un medico / . . .

P304+P340

IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.

P333+P313

In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362+P364

Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Lato superiore	
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 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2022
Revisione 4	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

