



BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics

L007445 • Rev. 11 • April 2015



MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE

I EINFÜHRUNG

Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics (Campylobacter-Thioglykollat-Medium mit 5 Antibiotika, Campy Thio) ist ein bis zur Inokulation des festen Mediums zu verwendendes Interimmedium für Proben, die vermutlich *Campylobacter jejuni* Subsp. *jejuni* enthalten.

II LEISTUNGSPRÜFUNG

A. TEST 1: *Campylobacter jejuni* Subsp. *jejuni*

1. Aus einer 24 bis 48 Std. alten Kultur von *C. jejuni* Subsp. *jejuni* auf **Trypticase**-Soja-Agar mit 5 % Schafsblut (TSA II) einen McFarland-Standard Nr. 1 herstellen.
2. Die standardisierte Kultur in **Trypticase**-Soja-Bouillon auf eine Konzentration von 10^{-3} verdünnen.
3. Ein Röhrchen Campy Thio mit 0,1 mL der verdünnten Kultur inokulieren. Mit dem Vortexmischer mischen.
4. Aus dem inokulierten Campy Thio-Röhrchen heraus unverzüglich eine TSA-II-Platte inokulieren (mit Tupfer aufnehmen und dann ausstreichen). Die Platte mit „Vor der Kühlung“ beschriften. Die Platte bei 42 ± 2 °C in einem mit einer **CampyPak**-Hülle aktivierten **GasPak**-Glas inkubieren oder das **GasPak** EZ Campy-System verwenden. Nach 36 bis 48 Std. im Hinblick auf das Ausmaß des Wachstums von *C. jejuni* Subsp. *jejuni* untersuchen.
5. Die inokulierten Campy Thio-Röhrchen unverzüglich über Nacht (16 bis 24 Std.) bei 2 bis 8 °C kühl lagern. Hierfür KEINE CampyPak-Hüllen oder Gläser verwenden.
6. Nach der Über-Nacht-Kühlung eine Subkultur des inokulierten Campy Thio-Röhrchens anlegen. Mit einem Tupfer aufnehmen und dann auf einer TSA-II-Platte ausstreichen. Die Platte mit „Nach der Kühlung“ beschriften.
7. Die Platte bei 42 ± 2 °C in einem mit einer **CampyPak**-Hülle aktivierten **GasPak**-Glas inkubieren oder das **GasPak** EZ Campy-System verwenden.
8. Die Platte nach 36 bis 48 Std. im Hinblick auf das Ausmaß des Wachstums untersuchen.

B. TEST 2: Gemischte Flora

1. Aus einer 18 bis 24 Std. alten Kultur mit gemischter Flora (einer 1 : 1 : 1-Mischung von *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* und *Candida albicans*) einen McFarland-Standard Nr. 1 herstellen.
2. Die standardisierte gemischte Flora auf 10^{-4} und 10^{-5} verdünnen.
3. Eine TSA-II-Platte mit 0,1 mL ausgestrichener 10^{-5} -Verdünnung inokulieren.
4. a. Ein Röhrchen Campy Thio mit 0,1 mL der 10^{-4} -Verdünnung inokulieren. Mit dem Vortexmischer mischen.
b. Mit 0,1 mL des inokulierten Campy Thio unverzüglich eine Platte Campylobacter Agar with 5 Antimicrobics and 10 % Sheep Blood (Campylobacter Agar mit 5 Antibiotika und 10 % Schafsblut, Campy-BAP) und eine TSA-II-Platte inokulieren und mit einem sterilen gläsernen Spatel gleichförmig ausstreichen. Die Platten mit „Vor der Kühlung“ beschriften.
5. Die Platten bei 42 ± 2 °C in einem mit einer **CampyPak**-Hülle aktivierten **GasPak**-Glas inkubieren oder das **GasPak** EZ Campy-System verwenden. Nach 36 bis 48 Std. im Hinblick auf das Ausmaß des Wachstums untersuchen.
6. Das Campy Thio-Röhrchen unverzüglich über Nacht (16 bis 24 Std. lang) bei 2 bis 8 °C kühl lagern. Hierfür KEINE **CampyPak**-Hüllen oder Gläser verwenden.
7. Nach der Über-Nacht-Kühlung eine Subkultur anlegen; dazu die Spitze einer Pipette ca. 2 cm unterhalb der Campy Thio-Oberfläche halten und unter langsamem Zurückziehen der Spitze bis zur Oberfläche kontinuierlich eine Probe aspirieren. Zum Inokulieren mit Hilfe eines

sterilen gläsernen Spatels 0,1 mL auf eine Campy-BAP- und eine TSA-II-Platte ausstreichen. Die Platten mit „Nach der Kühlung“ beschriften.

8. Die Platten bei 42 ± 2 °C in einem mit einer **CampyPak**-Hülle aktivierten **GasPak**-Glas inkubieren oder das **GasPak EZ** Campy-System verwenden.
9. Die Platten nach 36 bis 48 Std. im Hinblick auf das Ausmaß des Wachstums untersuchen.

C. Zu erwartende Ergebnisse

<i>Campylobacter jejuni</i> Subsp. <i>jejuni</i> *ATCC 33291	Die Wiederfindung bei Proben „Nach der Kühlung“ auf TSA-II-Platten sollte maximal eine um einen Wert geringe Wachstumsrate aufweisen als die Probe „Vor der Kühlung“.
--	---

Kulturen mit gemischter Flora, bestehend aus einer 1 : 1 : 1-Mischung von:

* <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Die gemischte Flora sollte auf der Campy-BAP-Platte gehemmt sein (teilweise bis vollständig). Das Wachstum (die Anzahl) der gemischten Kultur (10^4) des Campy Thio-Röhrchens auf TSA II muss im Vergleich zum Wachstum (zur Anzahl) gemischter Kulturen (10^5) vom Verdünnungsröhrchen auf TSA II reduziert sein.
* <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	
* <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	

* Empfohlener Stamm des Mikroorganismus für die Qualitätskontrolle durch den Anwender.

III ZUSÄTZLICHE QUALITÄTSKONTROLLE

1. Die Röhrchen untersuchen, wie unter „Haltbarkeit des Produkts“ beschrieben.
2. Repräsentative Röhrchen visuell überprüfen, um sicherzustellen, dass ihre Nutzung nicht durch bereits vorhandene Beschädigungen beeinträchtigt werden kann.
3. Nicht inokulierte repräsentative Röhrchen bei 20 – 25 °C und bei 30 – 35 °C inkubieren und nach 7 Tagen auf Kontamination durch Mikroorganismen untersuchen.

PRODUKTINFORMATIONEN

IV VERWENDUNGSZWECK

Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics (Campylobacter-Thioglykolat-Medium mit 5 Antibiotika) wird als Interimmedium für Proben empfohlen, die vermutlich *Campylobacter jejuni* Subspez. *jejuni* enthalten, wenn die unverzügliche Inokulation des Campylobacter Agar with 5 Antimicrobics and 10 % Sheep Blood (Campylobacter-Agar mit 5 Antibiotika und 10 % Schafsblut) nicht möglich ist.

V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Dekeyser et al. vermeldeten 1972 die Isolierung von *C. jejuni* aus dem Kot von Patienten mit Diarrhö und akuter Gastroenteritis; sie verwendeten dazu eine Filtrierungstechnik und ein selektives Medium mit Antibiotika, um die normale enterische Flora zu unterdrücken.¹ Skirrow berichtete 1977 über ein selektives Kulturmedium mit drei Antibiotika.² Blaser et al. meldeten die erfolgreiche Isolierung von *C. jejuni* durch direkte Inokulation von Stuhlproben auf ein Agar-Medium mit vier Antibiotika und Inokulation dieses Mediums mit Stuhlabstrichproben, die 8 Std. lang in Thioglykolat-Bouillon (0,16 % Agar) mit denselben vier Antibiotika gekühlt aufbewahrt wurden.^{3,4} Ein fünftes Antibiotikum, Cephalothin, wurde später in diese Technik integriert, um nicht-pathogenen *C. fetus* Subsp. *fetus* zu hemmen.⁴

Campylobacter-Thioglykolat-Medium wird als Interimmedium empfohlen, wenn die Möglichkeit eines sofortigen Ausstreichens und Inkubierens nicht gegeben ist und auf Grund eines verzögerten Probenverkehrs zum Labor oder auf Grund des Verstreichens des akuten Krankheitsstadiums nur geringe Anzahlen zu erwarten sind.^{5,6}

Angaben zum aktuellen Taxonomiestatus bietet Nachamkin.⁶

VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Campylobacter Thioglycollate Medium (Campylobacter-Thioglykolat-Medium) ist ein selektives Interimmedium für die Isolierung von *C. jejuni* Subsp. *jejuni* aus klinischen Proben. Die Integration der Antibiotika, d.h. von Amphotericin B, Cephalothin, Polymyxin B, Trimethoprim und Vancomycin, sowie die Kühlung hemmen die weitere Vermehrung der normalen Bakterienflora in Kotproben, was die Isolierung von *C. jejuni* Subsp. *jejuni* ermöglicht.

VII REAGENZIEN

Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics

Ungefähre Zusammensetzung* je 1 L destilliertes Wasser

Pankreatisch abgebautes Casein	17,0 g
Papainisch abgebautes Sojamehl	3,0 g
Dextrose	6,0 g
Natriumchlorid	2,5 g
Natriumthioglykolat	0,5 g
Agar	1,6 g
L-Cystin	0,25 g
Natriumsulfit	0,1 g
Amphotericin B	2,0 mg
Cephalothin	15,0 mg
Trimethoprim	5,0 mg
Vancomycin	10,0 mg
Polymyxin B	2500,0 Einheiten

*Nach Bedarf auf die Leistungskriterien abgestimmt und/oder ergänzt.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum.

Röhrchen mit fest angebrachten Kappen sollten vorsichtig geöffnet werden, um Verletzungen durch Glasbruch zu vermeiden.

Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, wie z.B. Hepatitis-Viren und HIV, enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen“⁷⁻¹⁰ sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten. Nach Gebrauch präparierte Röhrchen, Probenbehälter und andere kontaminierte Materialien im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Aufbewahrung

Die Röhrchen nach Erhalt im Dunkeln bei 2 – 8 °C lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor Lichteinwirkung schützen. In den Röhrchen gemäß Kennzeichnung aufbewahrte Medien können bis zum Verfallsdatum inokuliert und für die empfohlene Zeitdauer inkubiert werden.

Haltbarkeit des Produkts

Röhrchen mit Anzeichen von Kontamination durch Mikroorganismen, Verfärbung, Eintrocknen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

VIII PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Kultivierbare Proben können auf unterschiedliche Weise gehandhabt werden. Detaillierte Informationen der einschlägigen Fachliteratur entnehmen.^{11,12} Die Proben sollten vor der Anwendung von Antibiotika entnommen werden. Für einen umgehenden Transport zum Labor ist zu sorgen.

IX VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte nach Bedarf.

Testverfahren

Aseptisch vorgehen.

1. Probenentnahme, Lagerung und Subkultivierung auf Mediumplatten.¹³

Rektaltupfer ca. 1 cm tief in das Medium einführen und zwirbeln. Den Tupfer entfernen oder bis zum Röhrchenboden absenken, und den Tupferschaft auf der Höhe des Röhrchenrands abbrechen, so dass der Schaft erreichbar bleibt.

Bei festen Stühlen eine Suspension mit Kochsalzlösung herstellen, in einem mechanischen Mixer vermischen (d.h. mit dem Vortexmischer) und etwa 1 cm unterhalb der Oberfläche fünf Tropfen in das Medium geben. Oder einen Tupfer in alle Bereiche des Stuhls einstechen und das Medium wie mit einem Rektaltupfer inokulieren.

Bei flüssigen Stühlen etwa 1 cm unterhalb der Oberfläche fünf Tropfen in das Medium geben.

Das inokulierte Campylobacter-Thioglykolat-Medium über Nacht kühlen und am nächsten Tag auf Platten Campylobacter Agar with 5 Antimicrobics and 10% Sheep Blood (Campylobacter-Agar mit 5 Antibiotika und 10 % Schafsblut) eine Subkultur anlegen. Dazu eine Pasteur-Pipette ca. 2 cm unterhalb der Bouillon-Oberfläche halten und unter langsamem Zurückziehen der Spitze bis zur Oberfläche kontinuierlich eine Probe aspirieren. Nicht auf nicht-selektiven Medien subkultivieren, da die normale Flora noch lebensfähig sein kann.

2. Inkubation von Mediumplatten.

Die Mediumplatten bei 42 °C in einer sauerstoffreduzierten, kohlendioxidangereicherten Atmosphäre inkubieren. Diese Atmosphäre kann erzeugt werden mit einer **BBL CampyPak**-Einmal-Hülle mit Gasgenerator in einem **GasPak**-100-Glas, mit drei Hüllen in einem **GasPak**-150-Glas oder mit **BBL CampyPouch**, **Bio-Bag** (Typ Cfj) oder **GasPak EZ** Campy-Systemen. Alternativ lässt sich die Atmosphäre auch durch Evakuieren von entlüftbaren **GasPak**-Gläsern und Ersetzen durch Zylindergase⁶ oder nach dem Fortner-Prinzip erzeugen.¹⁴

Qualitätskontrolle durch den Anwender

Siehe „Maßnahmen zur Qualitätskontrolle“.

Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die laborinternen Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Anwender sollten die relevanten CLSI-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

X ERGEBNISSE

Platten des Campylobacter Agar with 5 Antimicrobics and 10 % Sheep Blood (Campylobacter-Agar mit 5 Antibiotika und 10 % Schafsblut), welche aus Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics (Campylobacter-Thioglykolat-Medium mit 5 Antibiotika) inokuliert wurden, sind im Hinblick auf das Vorhandensein von Kolonien an *Campylobacter jejuni* Subsp. *jejuni* zu untersuchen. Derartige Kolonien auf Campylobacter-Agar erscheinen nach 24 und 48 Std. und sind klein, schleimhaltig, gewöhnlich grau gefärbt, flach mit unregelmäßigen Rändern und nicht hämolytisch.¹⁵

Nach 18 bis 24 Std. sind die Kolonien u.U. noch kaum erkennbar. Eine andere, offenbar stammesverwandte Kolonien-Morphologie besteht aus runden, konvexen, ungeteilten, glänzenden Kolonien von 1 bis 2 mm Durchmesser.¹⁵ Ein geringer Prozentsatz der Stämme kann hellbraun oder leicht rosa gefärbt sein.¹³

Die Kolonien neigen zur Ausdehnung bzw. Ausbreitung, besonders wenn sie ursprünglich von frischen klinischen Proben isoliert wurden. Hinweis: Sollten die Platten nach 24-stündiger Inkubation untersucht werden, sind sie als anaerobe Kulturen zu behandeln, d.h. rasch zu untersuchen und danach unverzüglich wieder in die sauerstoffreduzierte Atmosphäre einzubringen.

XI VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Zur Identifizierung muss der Mikroorganismus in Reinkultur vorliegen. Für die endgültige Identifizierung sind morphologische, biochemische und/oder serologische Tests erforderlich. Detaillierte Informationen und empfohlene Verfahren sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.^{11,12,16}

XII LEISTUNGSMERKMALE

Die kombinierte Ausbeute bei Verwendung von Campylobacter-Blutagar und Campylobacter-Thioglykolat-Medium (beide mit fünf Antibiotika) ist Berichten zufolge um 33 % höher als bei ausschließlicher Verwendung von Medienplatten und um 28 % höher als bei ausschließlicher Verwendung von Bouillon-Medium.⁴ Nach Luechtefeld et al. war die Anzahl der Positiven nicht wesentlich erhöht, wenn Truthahn-Kotproben bei 4 °C über Nacht in Campylobacter-Thioglycollat-Medium aufbewahrt wurden.¹⁷

XIII LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
221747	BD BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics, Packung zu 10 Röhrchen der Größe K
221748	BD BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics, Karton zu 100 Röhrchen der Größe K

XIV LITERATUR

1. Dekeyser, P., M. Gossuin-Detrain, J.P. Butzler, and J. Sternon. 1972. Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. *J. Infect. Dis.* 125:390-392.
2. Skirrow, M.B. 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br. Med. J.* 2:9-11.
3. Blaser, M., J. Cravens, B.W. Powers, and W.L. Wang. 1978. *Campylobacter* enteritis associated with canine infection. *Lancet* 2:979-980.
4. Blaser, M.J., V. Berkowitz, F.M. LaForce, J. Cravens, L.B. Reller, and W-L.L. Wang. 1979. *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiologic features. *Ann. Intern. Med.* 91:179-185.
5. Reller, L.B., W-L.L. Wang, and M.J. Blaser. 1979. *Campylobacter* enteritis: *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*. ASCP Check Sample, Microbiology No. MB-99, Commission on Continuing Education, American Society of Clinical Pathologists, Chicago.
6. Nachamkin, I. 1999. *Campylobacter* and *Archobacter*, p. 716-726. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
8. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 17:53-80.
9. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
10. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). *Official Journal L262*, 17/10/2000, p. 0021-0045.
11. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.). 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
13. Kaplan, R.L. 1980. *Campylobacter*, p. 235-241. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., and J.P. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 3rd ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
14. Karmali, M.A., and P.C. Fleming. 1979. Application of the Fortner principle to isolation of *Campylobacter* from stools. *J. Clin. Microbiol.* 10:245-247.
15. Smibert, R.M. 1984. Genus *Campylobacter* Sebald and Veron 1963, 907, p. 111-118. In N.R. Krieg, and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
16. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. *Bergey's Manual™ of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
17. Luechtefeld, N.W., W-L.L. Wang, M.J. Blaser, and L.B. Reller. 1981. Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from turkey fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 13:438-443.

BD Diagnostics Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung oder www.bd.com/ds.



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD