



BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics



L007445 • Rev. 11 • Aprile 2015

PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ

I INTRODUZIONE

BBL Campylobacter Thioglycollate Medium (Campy Thio) (terreno **BBL Campylobacter** tioglicollato) con 5 antibiotici è un terreno di conservazione per campioni che si sospetta contengano *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* prima dell'inoculo di terreno solido.

II PROCEDURA DEL TEST

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

1. Preparare uno standard McFarland n. 1 da una coltura di 24 – 48 h in **Trypticase Soy Agar** con sangue di montone al 5% (TSA II) di *C. jejuni* ssp. *jejuni*.
2. Diluire la coltura standardizzata in **Trypticase Soy Broth** a una concentrazione 10^{-3} .
3. Inoculare una provetta di Campy Thio con 0,1 mL della coltura diluita. Mescolare vortexando.
4. Dalla provetta Campy Thio inocolata, inoculare immediatamente (con tampone e striscio) una piastra TSA II. Apporre alla piastra l'etichetta "pre-refrigerazione". Incubare la piastra a 42 ± 2 °C in un recipiente **GasPak** attivato con una busta **CampyPak** oppure usare il sistema **GasPak EZ Campy**. Dopo 36 – 48 h, verificare l'entità della crescita di *C. jejuni* ssp. *jejuni*.
5. Refrigerare immediatamente le provette Campy Thio inocolate per una notte (16 – 24 h) a 2 – 8 °C. **NON USARE** un recipiente o una busta **CampyPak**.
6. Al termine del suddetto ciclo di refrigerazione, eseguire una subcoltura della provetta Campy Thio inocolata. Strisciare con tampone su una piastra TSA II. Apporre alla piastra l'etichetta "post-refrigerazione".
7. Incubare la piastra a 42 ± 2 °C in un recipiente **GasPak** attivato con una busta **CampyPak** oppure usare il sistema **GasPak EZ Campy**.
8. Dopo 36 – 48 h, verificare l'entità della crescita sulla piastra.

B. TEST 2: flora mista

1. Preparare uno standard McFarland n. 1 da una coltura di flora mista di 18 – 24 h (costituita da una miscela 1:1:1 di *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*).
2. Preparare diluizioni 10^{-4} e 10^{-5} dalla flora mista standardizzata.
3. Usando la diluizione 10^{-5} , distribuire inoculando 0,1 mL su una piastra TSA II.
4. a. Usando la diluizione 10^{-4} , inoculare una provetta di Campy Thio con 0,1 mL. Mescolare vortexando.
b. Inoculare immediatamente 0,1 mL dalla provetta Campy Thio inocolata su una piastra **Campylobacter Agar** con 5 antibiotici e sangue di montone al 10% (Campy-BAP) e una piastra TSA II e distribuire uniformemente con un apposito distributore in vetro sterile. Apporre alle piastre l'etichetta "pre-refrigerazione".
5. Incubare le piastre a 42 ± 2 °C in un recipiente **GasPak** attivato con una busta **CampyPak** oppure usare il sistema **GasPak EZ Campy**. Dopo 36 – 48 h, verificare l'entità della crescita.
6. Refrigerare immediatamente la provetta Campy Thio per una notte (16 – 24 h) a 2 – 8 °C. **NON USARE** un recipiente o una busta **CampyPak**.
7. Dopo tale ciclo di refrigerazione, eseguire una subcoltura posizionando il puntale di una pipetta circa 2 cm al di sotto della superficie della provetta Campy Thio e prelevando continuamente il campione a mano a mano che il puntale viene lentamente riportato verso la superficie. Inoculare 0,1 mL sulla una piastra Campy-BAP e una piastra TSA II distribuendo con un apposito distributore di vetro sterile. Apporre alle piastre l'etichetta "post-refrigerazione".

8. Incubare le piastre a 42 ± 2 °C in un recipiente **GasPak** attivato con una busta **CampyPak** oppure usare il sistema **GasPak EZ Campy**.
 9. Dopo 36 – 48 h, verificare l'entità della crescita sulle piastre.
- C. Risultati attesi

<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> *ATCC™ 33291	Il recupero di campioni "post-refrigerazione" su piastra TSA II deve essere inferiore di non più di un punto di crescita a quello del campione "pre-refrigerazione".
---	--

La coltura di flora mista consiste in una miscela 1:1:1 di:

* <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	La flora mista deve essere inibita (in modo parziale – completo) sulla piastra Campy-BAP. La crescita (conte) di coltura mista (10^4) dalla provetta Campy Thio su TSA II deve essere ridotta rispetto alla crescita (conte) della coltura mista (10^5) dalla provetta di diluizione su TSA II.
* <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	
* <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	

*Ceppo batterico raccomandato per il controllo di qualità a cura dell'utente.

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

1. Esaminare le provette come descritto in "Deterioramento del prodotto".
2. Eseguire un esame visivo delle provette rappresentative per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
3. Incubare a 20 – 25 °C e a 30 – 35 °C le provette rappresentative non inoculate ed esaminarle dopo 7 giorni per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

IV USO PREVISTO

Il terreno **BBL Campylobacter Thioglycollate Medium** con 5 antibiotici è raccomandato per conservare campioni sospettati di contenere *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* qualora questi non possano essere inoculati immediatamente in **Campylobacter Agar** con 5 antibiotici e sangue di montone al 10%.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Nel 1972, Dekeyser et al. hanno documentato l'isolamento di *C. jejuni* dalle feci di pazienti con diarrea e gastroenterite acuta mediante una tecnica di filtrazione e un terreno selettivo con antibiotici per sopprimere la normale flora enterica.¹ Nel 1977, Skirrow ha descritto un terreno di coltura selettivo contenente tre antibiotici.² Blaser et al. hanno illustrato il successo conseguito nell'isolare *C. jejuni* mediante inoculo diretto di campioni fecali su un terreno agar contenente quattro antibiotici e inoculando poi quest'ultimo con tamponi di feci refrigerati per 8 h in brodo tioglicollato (agar 0,16%) contenente gli stessi quattro antibiotici.^{3,4} Successivamente, è stato incorporato un quinto antibiotico – la cefalotina – per inibire i ceppi non patogeni di *C. fetus* ssp. *fetus*.⁴

L'uso di **BBL Campylobacter Thioglycollate Medium** come terreno di conservazione è raccomandato nei casi in cui le attrezzature di striscio e incubazione non siano immediatamente disponibili, quando ci si attende una carica batterica limitata a causa di ritardi nel trasporto dei campioni al laboratorio o del superamento della fase acuta della malattia.^{5,6}

Per una valutazione dell'attuale stato tassonomico, consultare Nachamkin.⁶

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

BBL Campylobacter Thioglycollate Medium è un terreno selettivo di conservazione raccomandato per l'isolamento di *C. jejuni* ssp. *jejuni* da campioni clinici. L'incorporazione di agenti antibiotici quali anfotericina B, cefalotina, polimixina B, trimetoprim e vancomicina e la refrigerazione inibisce l'ulteriore moltiplicazione della normale flora batterica nei campioni fecali, facilitando così l'isolamento di *C. jejuni* ssp. *jejuni*.

VII REAGENTI

BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Digerito pancreatico di caseina	17,0 g
Digerito papaico di farina di soia	3,0 g
Destrosio	6,0 g
Cloruro di sodio	2,5 g
Tioglicollato di sodio	0,5 g
Agar	1,6 g
L-cistina	0,25 g
Solfito di sodio	0,1 g
Anfotericina B	2,0 mg
Cefalotina	15,0 mg
Trimethoprim	5,0 mg
Vancomicina	10,0 mg
Polimixina B	2500,0 unità

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di performance.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro.

Aprire con estrema cautela le provette con i tappi serrati allo scopo di evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e i virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle norme dell'istituto e alle "Precauzioni standard".⁷⁻¹⁰ Prima dello smaltimento, sterilizzare in autoclave le provette preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati.

Istruzioni per la conservazione

Al ricevimento, conservare le provette al buio a 2 – 8 °C. Evitare congelamento e surriscaldamento. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. I terreni in provetta conservati come indicato sull'etichetta sino al momento dell'uso, possono essere inoculati fino alla data di scadenza e incubati per i tempi di incubazione raccomandati.

Deterioramento del prodotto

Non usare le provette se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento o altri segni di deterioramento.

VIII RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I campioni idonei per coltura possono essere manipolati con varie tecniche. Per informazioni dettagliate, consultare la documentazione appropriata.^{11,12} Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

IX PROCEDURA

Materiale fornito

BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 antimicrobics

Materiali necessari ma non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Procedura del test

Adottare tecniche asettiche.

1. Raccolta, conservazione e subcoltura dei campioni in terreno in piastra.¹³

Inserire il tampone rettale per circa 1 cm nel terreno e ruotarlo. Rimuovere il tampone o abbassarlo sul fondo della provetta e romperne l'astina allo stesso livello del bordo della provetta per consentire di accedere agevolmente all'astina.

In caso di feci solide, preparare una sospensione di soluzione fisiologica, mescolare in un miscelatore meccanico (ossia vortex) e dispensare cinque gocce nel terreno, circa 1 cm al di sotto della superficie. In alternativa, introdurre un tampone in tutte le aree del campione fecale e inoculare il terreno come descritto per il tampone rettale.

In caso di feci diarroiche, dispensare cinque gocce nel terreno a circa 1 cm al di sotto della superficie.

Refrigerare il terreno **BBL Campylobacter Thioglycollate Medium** per una notte; il giorno seguente, eseguire una subcoltura in piastre di **Campylobacter Agar** con 5 antibiotici e sangue di montone al 10%, usando una pipetta Pasteur inserita di circa 2 cm al di sotto della superficie del brodo e continuando a prelevare il campione a mano a mano che il puntale viene lentamente riportato verso la superficie. Non eseguire una subcoltura in terreni non selettivi perché la normale flora potrebbe essere ancora vitale.

2. Incubazione del terreno in piastra

Incubare il terreno in piastra a 42 °C in un'atmosfera con ridotta concentrazione di ossigeno e arricchita con anidride carbonica. Questa atmosfera può essere ottenuta usando una busta monouso per lo sviluppo di gas **BBL** in un recipiente **GasPak 100**, tre buste in un recipiente **GasPak 150** oppure usando i sistemi **BBL CampyPouch**, **Bio-Bag Type Cfj** o **GasPak EZ Campy**. In alternativa, l'atmosfera può essere ottenuta mediante svuotamento dei recipienti ventilati **GasPak** e riempimento con gas da contenitori appositi,⁶ oppure usando il principio di Fortner.¹⁴

Controllo di qualità a cura dell'utente

Vedere "Procedure di controllo di qualità".

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI in merito.

X RISULTATI

Esaminare le piastre di **Campylobacter Agar** con 5 antibiotici e sangue di montone al 10% inoculate con il terreno **Campylobacter Thioglycollate Medium** con 5 antibiotici per verificare la presenza di colonie di *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni*. Queste colonie su **Campylobacter agar** appaiono piccole, mucose, generalmente di colore grigiastro, piatte con bordi irregolari e non emolitiche a 24 e 48 h.¹⁵

A 18 – 24 h, è possibile che le colonie siano solo scarsamente visibili. Una morfologia alternativa delle colonie, apparentemente correlata al ceppo, è costituita da colonie rotonde, del diametro di 1 – 2 mm, convesse, intere e brillanti.¹⁵ Una piccola percentuale di ceppi può apparire di colore marrone chiaro o leggermente roseo.¹³

Le colonie tendono a diffondersi o spostarsi, soprattutto allorché isolate da campioni clinici freschi.

Nota - Se si esaminano le piastre dopo 24 h di incubazione, trattarle come se fossero colture anaerobiche, vale a dire esaminarle velocemente e riporle in un'atmosfera a concentrazione ridotta di ossigeno subito dopo l'esame.

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Ai fini dell'identificazione, i microrganismi devono essere in coltura pura. Per l'identificazione finale, è necessario eseguire test morfologici, biochimici e/o sierologici. Per informazioni dettagliate e procedure raccomandate, consultare la documentazione appropriata.^{11,12,16}

XII PERFORMANCE

Il rendimento combinato ottenuto usando **Campylobacter agar** sangue e il terreno **BBL Campylobacter Thioglycollate Medium**, entrambi contenenti cinque antibiotici, è risultato superiore del 33% e del 28% a quelli ottenuti usando rispettivamente soltanto il terreno in piastra e il solo terreno in brodo.⁴ Luechtefeld et al. hanno registrato un aumento non sostanziale del numero di risultati positivi conservando campioni fecali di tacchino a 4 °C per una notte nel terreno **BBL Campylobacter Thioglycollate Medium**.¹⁷

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
221747	BD BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 antimicrobics, confezione da 10 provette di misura K
221748	BD BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 antimicrobics, scatola da 100 provette di misura K

XIV BIBLIOGRAFIA

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.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito 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