



ISTRUZIONI PER L'USO

CAMPYLOBACTER AGAR BLASER WANG

Piastre pronte all'uso

*Campylobacter jejuni* su piastra di
Campylobacter Agar Blaser Wang**1 - DESTINAZIONE D'USO**Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo per l'isolamento di *Campylobacter* spp. da campioni fecali.**2 - COMPOSIZIONE FORMULA TIPICA***

Peptocomplex	10,000 g
Triptosio	10,000 g
Peptone	3,000 g
Amido di mais	1,000 g
Sodio cloruro	5,000 g
Agar	14,000 g
Acqua purificata	950 mL
Sangue defibrinato di montone	50 mL
Amfotericina B	2,0 mg
Cefalotina	15,0 mg
Trimetoprim	5,0 mg
Vancomicina	10,0 mg
Polimixina B	2500 IU

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO*Campylobacter* è un piccolo bastoncino Gram negativo, ossidasi positivo, dotato di un flagello polare ad una o ad entrambe le estremità, a forma elicoidale, ricurva ad "S" o a "V", mobile, con una caratteristica mobilità "a cavatappo".¹Sono nutrizionalmente esigenti e crescono in condizioni strettamente anaerobiche o microaerobiche (atmosfera con circa il 5-10% di O₂ e il 5-10% di CO₂), ma un certo numero di specie, tra cui *C. concisus*, *C. curvus*, *C. gracilis*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae* e alcuni ceppi di *C. hyointestinalis*, richiedono un'atmosfera arricchita di idrogeno (3-7%) per la crescita, una condizione non utilizzata di routine nei laboratori diagnostici.²Le infezioni gastrointestinali da *Campylobacter* si contraggono per ingestione di pollame, frutti di mare, carne e prodotti poco cotti, per contatto con animali e per l'assunzione di acqua o latte non trattati. In alcuni casi, l'infezione può progredire colpendo siti extra-intestinali con rischi significativi per la vita del paziente. *C. jejuni* rappresenta circa il 90% delle infezioni segnalate e la maggior parte delle restanti sono causate da *C. coli* e *C. lari*; anche altre specie di *Campylobacter* sono state isolate, molto meno frequentemente, da pazienti con diarrea (*C. helveticus*, *C. upsaliensis*, *C. hominis*, *C. gracilis*, *C. lanienae*, *C. peloridis*, *C. concisus*, *C. mucosalis*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. sputorum*, *C. insulaenigrae*.)² Le specie più comunemente associate alla malattia nell'uomo sono termofile, cioè crescono a 42-43°C ed a 37°C, ma non a 25°C; *C. jejuni* supsp. *doyley*, *C. fetus* e *C. fetus* supsp. *venerealis* non crescono a 42°C.³Dagli anni settanta, quando si incominciò ad associare *Campylobacter* alle tossinfezioni alimentari, sono stati sviluppati numerosi terreni di coltura liquidi ed agarizzati, originariamente studiati per l'esame delle feci e poi estesi alla ricerca di *Campylobacter* negli alimenti e nell'acqua e costituiti essenzialmente da una base non selettiva da impiegare con o senza sangue animale e da miscele di composti antimicrobici; tra i terreni d'isolamento proposti in letteratura, la rassegna di Corry e Atabay³ cita i terreni Skirrow, Blaser Wang, Preston, mCCD Bolton, mCCD Hutchinson e Bolton, Karmali, Line TTC.Campylobacter Agar Blaser Wang (noto anche come Campy-BAP) è preparato secondo la formulazione descritta da Blaser e Wang,⁵ che modificarono la formulazione di Skirrow aggiungendo cefalotina e amfotericina B e sostituendo il sangue lisato di cavallo con sangue defibrinato di montone. I peptoni forniscono azoto, carbonio e oligoelementi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine del gruppo B. Il sangue di montone fornisce nutrienti aggiuntivi. Gli agenti selettivi del terreno sono la vancomicina, con una forte attività inibitoria verso i batteri Gram-positivi, la polimixina B, la cefalotina ed il trimetoprim, che sopprimono principalmente la crescita dei batteri Gram-negativi e l'amfotericina B, inclusa come composto antifungino.**4 - CARATTERISTICHE FISICHE**Aspetto del terreno in piastra rosso, opaco
pH (20-25°C) 7,3 ± 0,2**5 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Campylobacter Agar Blaser Wang CND: W0104010405; EDMA: 14.01.04.01; RDM: 1443268/R	Piastre pronte all'uso	541111	2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Termostato ed altra strumentazione di laboratorio, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori, materiali per la generazione dell'atmosfera di incubazione controllata.





7 - CAMPIONI

I campioni fecali sono preferibili per isolare *Campylobacter* spp. da pazienti con infezioni gastrointestinali; tuttavia, sono anche accettabili i tamponi rettali.⁵ 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.

8 - 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: ruotare 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.³

Nel caso si sospetti la presenza di specie non termofile, incubare le piastre inoculate a 37 ± 2°C in atmosfera microaerobica.

9 - 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.²

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.^{2,5}

10 - 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 responsabilità 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.⁶

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE (T°/ t / ATM)	RISULTATI ATTESI
<i>C.jejuni</i> ATCC 33291	41-42°C / 40-48 h / M	buona crescita
<i>E.coli</i> ATCC 25922	41-42°C / 40-48 h / M	crescita parzialmente o totalmente inibita

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

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre pronte all'uso di *Campylobacter* Agar Blaser Wang e delle materie prime impiegate per la produzione, terreno in polvere Columbia Agar Base (REF 401136) preparato con l'aggiunta di Blaser Wang Antimicrobic Supplement e sangue defibrinato di montone, 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 ecometrico semi-quantitativo con i ceppi target *C.coli* ATCC 43478 e *C.jejuni* ATCC 33291. Dopo l'incubazione a 41-42°C per 40-48 ore in condizioni microaerobiche, viene valutata e registrata l'entità della crescita. Entrambi i ceppi mostrano una buona crescita.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificate appropriate diluizioni di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5, dei seguenti ceppi non target: *C.albicans* ATCC 60193, *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 19433, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *P.rettgeri* ATCC 39944, *P.mirabilis* ATCC 12453. Dopo incubazione, *E.coli*, *C.albicans*, *P.aeruginosa* e *P.rettgeri* risultano parzialmente inibiti mentre gli altri ceppi non target sono completamente inibiti.

12 - LIMITI DEL METODO

- La cefalotina e la polimixina B possono inibire alcuni ceppi di *C. jejuni* e *C. coli* e di altre specie di *Campylobacter* meno comuni, come *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis* e *C. fetus*.²
- Per ottimizzare i risultati nell'isolamento di *Campylobacter* dai campioni fecali, è opportuno una combinazione di terreni basati su diversi sistemi selettivi (es. Terreno Blaser Wang e un terreno meno selettivo senza sangue, come Karmali o CCDA).²
- Alcune specie di *Campylobacter*, come *C. concisus*, *C. rectus*, *C. curvus*, *C. gracilis* e *C. showae* richiedono un'atmosfera arricchita di idrogeno (3-7%) per la crescita. Queste specie di solito non vengono recuperate nelle condizioni microaerobiche convenzionali con una concentrazione di idrogeno inferiore al 2%.^{2,5}
- *Campylobacter* spp. hanno temperature ottimali differenti per la crescita. La scelta della temperatura di incubazione per colture di routine delle feci è fondamentale per determinare lo spettro delle specie che verranno isolate.⁵ *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. fetus* e *C. fetus* sottospecie *venerealis* non crescono a 42°C.³
- Le formulazioni prive di sangue (ad es. Karmali, CCDA) sembrano avere prestazioni migliori rispetto ai terreni contenenti sangue.⁵
- 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*.⁵ L'arricchimento sembra non essere necessario per i campioni raccolti nella fase acuta della 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.^{7,8}
- 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 qui descritto è 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.



**13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE**

- Il terreno in piastra 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.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali 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 d'uso 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.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- 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.











14 - 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. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Public Health England. Identification of Campylobacter species. ID23. Issue 3.1. 2018
3. Public Health England. Investigation of Faecal Specimens for Enteric Pathogens. ID30. Issue 8.1. 2014
4. Blaser MJ, Berkowicz ID, Laforce FM, Cravens J, Reller LB, Wang WL. Campylobacter enteritis: clinical and epidemiological features. *Ann Intern Med* 1979; 91:179-185.
5. Nachamkin I. Campylobacter and Arcobacter. *In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology*, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
6. CLSI (formerly NCCLS). Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004.
7. Bolton FJ, Robertson L. A selective medium for isolating Campylobacter jejuni/coli. *J Clin Pathol* 1982; 35:462
8. Hutchinson DN, Bolton FJ. Is enrichment culture necessary for the isolation of Campylobacter jejuni from faeces? *J Clin Pathol* 1983; 36:1350-1352

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	o REF	 LOT Numero di lotto	 IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro
 Limiti di temperatura		 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Non riutilizzare	 Fragile maneggiare con cura

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	09/2020

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

