
RAPID'*Campylobacter* Agar

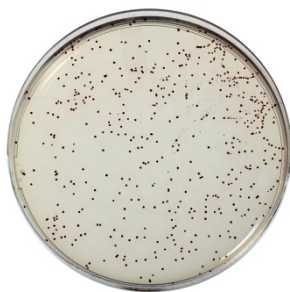
User Guide

Chromogenic media for the detection and enumeration of the main species of thermophilic *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari*) in food products and in environmental samples

Catalog #12012036, Prepared plates, 90 mm x 20 dishes

Catalog #3564295, Dehydrated, 500 g

Catalog #3564296, Supplement, freeze dried, 10 vials



BIO-RAD

Table of Contents

Section 1	Introduction	1
Section 2	RAPID' <i>Campylobacter</i> Principle	1
Section 3	Theoretical Formula	1
Section 4	Shelf Life and Storage	1
Section 5	Materials Required but Not Supplied	1
	Equipment.....	2
	Supplies	2
Section 6	Precautions, Limitations of Use, and Quality Control	2
Section 7	Protocol.....	3
	Preparation of Dehydrated Medium.....	3
	Detection of <i>Campylobacter</i> spp.....	4
	Enumeration of <i>Campylobacter</i> spp.	4
Section 8	Confirmation of Positive Results.....	4
Section 9	Confirmation of Other Methods.....	5
Section 10	Test Performance and Validation	5
Section 11	References.....	6
Section 12	Revision History	6

Section 1 Introduction

Campylobacter has emerged as the most frequent cause of gastroenteritis in humans. *C. jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* are the species most commonly identified as causing human infection. The bacteria live in the intestinal tracts of cattle, sheep, pigs and birds, and consequently foods of animal origin can become contaminated. The majority of *Campylobacter* infections are acquired through the consumption of contaminated water, raw and inadequately pasteurized milk, and undercooked meats, particularly poultry. The infectious dose of *Campylobacter* is thought to be as low as 500 bacteria. Surveillance indicates that millions of people are infected by *Campylobacter* each year. Testing for the presence of *Campylobacter* in food and in the processing environment is an important practice. The use of chromogenic substrates in culture media increases the ease of use of the media with results based on color change caused by enzymatic reactions.

Section 2 RAPID'*Campylobacter* Principle

The use of a selected nutritive mixture associated with reducing agent allows the growth of thermotolerant *Campylobacter* spp. in an optimal time. Other bacterial species, as well as yeasts and molds, are inhibited by the selective agents. *Campylobacter* produce brick-red colonies on RAPID'*Campylobacter*.

Section 3 Theoretical Formula

Nutritive mix	28.5 g
Selective agents	0.082 g
Chromogenic mix	0.05 g
Reducing mix	1 g
Sodium chloride	5 g
Buffer	1.25 g
Agar	14 g
Distilled water	qsp 1,000 ml

Final pH at 25°C = 7.2–7.5

Section 4 Shelf Life and Storage

- Dehydrated: 15–25°C in carefully sealed package, in a dry and dark place
- Supplement: 2–8°C in a dark place
- Pre-poured: 2–8°C in a dark place
- Plate prepared from the dehydrated base: 2 weeks at 2–8°C in carefully sealed package, in a dry and dark place
- Non-supplemented media: 6 weeks at 2–8°C in a dark place

Section 5 Materials Required but Not Supplied

Equipment

- All usual laboratory equipment
- Hot plate
- Scale, sensitivity of 0.1 g
- Stirrer/homogenizer
- Thermostatically-controlled incubator or incubation room, precise to $\pm 1^{\circ}\text{C}$
- Water bath

Supplies

- Confirmation: *Campylobacter* Confirm Latex (catalog #3564297); Columbia Agar (catalog #3563784); iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR Kit (catalog #3578135); Oxidase Test (catalog #35934260); Physiological Sterile Water (catalog #3554164); Sterile Water (catalog #3554154)
- Enrichment medium for detection: Bolton or Preston Broth
- Diluent for enumeration: Buffered Peptone Water, BPW Plus (catalog #3554179, 225 ml x 6 bottles; 3564684, 500 g; 3555790, 2 x 5 L bags; 3555795, 4 x 3 L bags); BPW Standard (catalog #12013258, 5 kg; 12013259, 500 g; 12013260, 2 x 5 L bags); Tryptone Salt (catalog #3555754, 9 ml x 25 tubes; 3555756, 225 ml x 6 bottles; 3564544, 500 g; 3555796, 3 L x 4 bags)
- Inoculating loops
- Sterile petri dishes (90 mm)
- Sterile pipets
- Sterile weigh bags

Section 6 Precautions, Limitations of Use, and Quality Control

Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 7218). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria such as *Campylobacter*
- Media that have come in contact with food samples should be considered contaminated and should be disposed of in accordance with local rules and regulations

Section 7 Protocol

- Do not expose petri dishes to light
- After preparation, let the Petri dishes stabilize for at least 1 night at room temperature
- Plates should be pre-dried before use to ensure that they are free of excess moisture (EN ISO 7218). For example, plates can be dried by placing them with the agar surface facing up in a laminar flow safety cabinet (at room temperature) for 20–30 min
- Confirming fewer than 5 colonies involves a risk of making an overestimation because of the presence of typical colonies that might not be *Campylobacter* spp.

Limitations of Use

- During the NF VALIDATION study, *Ralstonia mannitolytica* produced typical colonies on RAPID'*Campylobacter* after 48 hr of incubation. This strain, rarely found in food matrices, gives negative confirmation. It gives atypical agglutination reaction with *Campylobacter* Confirm Latex, weak and atypical in appearance (mucoid/curd) rather than the normal particulate agglutination, grainy, homogeneous, and dense
- During the NF VALIDATION study, *C. upsaliensis* was not able to grow on RAPID'*Campylobacter* agar
- If colonies are not easily countable after 24 hr of incubation, re-incubate the plate for a total of 48 hr
- In the event of discordant results (positive on RAPID'*Campylobacter*, negative on the confirmatory method), the laboratory must implement sufficient resources to ensure the validity of the result

Quality Control

- Every product manufactured and marketed by Bio-Rad is subject to a quality assurance procedure at all stages, from reception of raw materials through to marketing of the finished products. Each batch of finished product undergoes quality control according to EN ISO 11133 and is marketed only if it satisfies the acceptability criteria. Documentation relative to the production and quality control of each batch is kept on file.
- For SDS product safety information and certificate of analysis, visit www.bio-rad.com.

Section 7 Protocol

Preparation of Dehydrated Medium

1. Always shake bottle before use.
2. Dissolve 20 g of powder in 370 ml of distilled water and mix until a homogenous suspension is obtained.
3. Heat gently, agitating frequently, then bring to a boil.
4. Sterilize by autoclaving at 121°C for 15 min.

Section 8 Confirmation of Positive Results

5. Cool the medium to 47–50°C.
6. Aseptically rehydrate lyophilized supplement with 30 ml sterile distilled water. Stir until completely dissolved.
7. Aseptically add 1 vial of reconstituted supplement. Mix well and pour into petri dishes.
8. One 500 g bottle of powder makes 10 L of medium.

Detection of *Campylobacter* spp.

1. For standard method, follow enrichment protocol described in ISO 10272-1:2017.
2. For alternative method, dilute n g or n ml of sample in $9 \times n$ ml Bolton Broth or Preston Broth. For example, dilute 25 g or 25 ml of sample in 225 ml Bolton or Preston Broth to obtain a 1/10 dilution.
3. Homogenize with stirrer/homogenizer.
4. Incubate Bolton Broth at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 4–6 hr then at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 44 ± 4 hr in a microaerophilic atmosphere.
5. Incubate Preston Broth at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 hr in a microaerophilic atmosphere.
6. Using a sterile loop, streak 10 μl of enrichment broth on RAPID'*Campylobacter* Agar.
7. Incubate plate lid down at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24–48 hr in a microaerophilic atmosphere.
8. *Campylobacter* form brick-red colonies on RAPID'*Campylobacter* Agar.
9. After the incubation step, plates can be stored at 2–8°C for 72 hr.

Enumeration of *Campylobacter* spp.

1. Dilute n g or n ml of sample in $9 \times n$ ml of broth (according to ISO 10272-2 and ISO 6887). If necessary, perform a 1:10 dilution.
2. Spread 0.1 ml of sample and/or its decimal dilutions on a petri dish. If it is necessary to estimate small numbers, spread 1 ml of sample over three 90 mm dishes (~0.33 ml/dish).
3. Incubate plate for 44 ± 4 hr at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ in a microaerophilic atmosphere.
4. *Campylobacter* form brick-red colonies on RAPID'*Campylobacter* Agar.
5. After the incubation step, plates can be stored at 2–8°C for 72 hr.
6. Refer to EN ISO 7218 standard for inoculation, colony counting, calculation, and expression of results.

Section 8 Confirmation of Positive Results


Section 9 Confirmation of Positive Results

1. In the context of the standard method, perform confirmation tests as described in the ISO 10272-1 or ISO 10272-2 standards.
2. In the context of NF VALIDATION, all samples identified as positive must be confirmed in one of the following ways:
 - a. Using the conventional tests described in the ISO standard methods (including the purification step).
 - b. Using nucleic probes as described in the ISO 7218 standard (for example, iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR Kit) using isolated colonies (with or without purification step).
 - c. Performing a latex agglutination test using the *Campylobacter* Confirm Latex.
 - d. Using the MALDI Biotyper test (Bruker's Biotyper System includes a MALDI time-of-flight mass spectrometer and MBT Compass Software, version 4) directly from an isolated colony or after a purification step. The genus and/or species identification information given by the MALDI Biotyper Complete Solution is not included in the scope of the NF VALIDATION mark.
3. In the event of discordant results (presumptive positive with RAPID' *Campylobacter*, negative with confirmation method, particularly the latex test), the laboratory must follow the necessary steps to ensure validity of the result obtained.

Section 9 Confirmation of Other Methods

Not applicable.

Section 10 Test Performance and Validations

Certification	Scope	Validation Protocol	Reference Protocol	Certificate Reference
NF VALIDATION	Meat products, poultry and poultry products, and environmental samples	EN ISO 16140-2	ISO 10272-2	 BRD: 07/25-01/14 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Certified by AFNOR Certification http://nf-validation.afnor.org/en

Section 11 References

ISO 7218:2007/AMD1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 10272-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method.

ISO 10272-2:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration *Campylobacter* spp. — Part 2: Colony-count technique.

United States Department of Agriculture (2016). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 41.04: Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0273bc3d-2363-45b3-befb-1190c25f3c8b/MLG-41.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 9, 2020.

Section 12 Revision History

Release date	Document number	Change
November 2020	10000132429 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Major change- New document design- Document number change (previous version RAPID_Campylobacter_V04_20 August 2019)
November 2021	10000132429 Ver B	<ul style="list-style-type: none">- Clarification of plate drying protocol- Clarification of enumeration inoculation protocol- Update of references

Revision History References

Visit www.bio-rad.com/rapidmedia for more information on our complete range of RAPID chromogenic media

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK is a trademark of Bio-Rad Europe GMBH in certain jurisdictions.

All trademarks used herein are the property of their respective owner.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

*Life Science
Group*

Website *bio-rad.com* **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23
Mexico 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280
Norway 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188
South Africa 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23
Switzerland 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0122



10000132429 Ver B US/EG

RAPID'*Campylobacter* Agar

Guide d'utilisation

Milieu chromogénique pour la recherche et le dénombrement des principales espèces de *Campylobacter* thermophiles (*C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*) dans les produits alimentaires et échantillons environnementaux

N° de référence 12012036, boîte préparée, 90 mm x 20 boîtes

N° de référence 3564295, base déshydratée, 500 g

N° de référence 3564296, supplément, lyophilisé, 10 flacons



BIO-RAD

Sommaire

Section 1	Introduction	1
Section 2	RAPID' <i>Campylobacter</i> - Principe	1
Section 3	Formule théorique	1
Section 4	Durée de conservation et stockage	1
Section 5	Matériel requis non fourni	2
	Matériel	2
	Produits.....	2
Section 6	Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité	3
Section 7	Protocole	4
	Préparation du milieu de culture déshydraté	4
	Recherche des <i>Campylobacter</i> spp.	4
	Dénombrement des <i>Campylobacter</i> spp.....	5
Section 8	Confirmation des résultats positifs	5
Section 9	Confirmation d'autres méthodes	6
Section 10	Performance du test et validations	6
Section 11	Références	7
Section 12	Historique des révisions	8

Section 1 Introduction

La bactérie *Campylobacter* apparaît aujourd'hui comme la principale cause de gastroentérite chez l'Homme. *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* sont les espèces couramment identifiées comme origine de l'infection. La bactérie est présente dans le tractus intestinal des races bovines, ovines, porcines et aviaires. Par conséquent, les produits alimentaires issus de ces sources sont susceptibles d'être contaminés. La majorité des infections à *Campylobacter* ont lieu via la consommation d'eau contaminée, de lait cru inadéquatement pasteurisé et de viande insuffisamment cuite (en particulier la volaille). Il est considéré que le seuil aussi bas que 500 bactéries est la dose infectieuse pour les *Campylobacter*. Chaque année, des millions de personnes sont infectées par *Campylobacter*. La recherche de la bactérie dans les aliments et l'environnement de transformation est primordiale. L'utilisation de substrats chromogènes dans le milieu de culture augmente la simplicité de lecture grâce aux résultats par changement de couleur issu des réactions enzymatiques.

Section 2 RAPID'*Campylobacter* - Principe

L'utilisation d'un mélange nutritif sélectif associé à un agent réducteur favorise la croissance des *Campylobacter* spp. thermotolérantes dans un délai optimal. Les autres espèces bactériennes, ainsi que les levures et les moisissures, sont inhibées par les agents sélectifs. *Campylobacter* produit des colonies rouge brique sur le milieu RAPID' *Campylobacter*.

Section 3 Formule théorique

Mélange nutritif	28,5 g
Agents sélectifs	0,082 g
Mélange chromogène	0,05 g
Mélange réducteur	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Tampon	1,25 g
Agar	14 g
Eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

pH final à 25 °C = 7,2–7,5

Section 4 Durée de conservation et stockage

- Base déshydratée : 15–25 °C en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière
- Supplément : 2–8 °C à l'abri de la lumière
- Précoulé : 2–8 °C à l'abri de la lumière
- Boîte préparée à partir de la base déshydratée : 2 semaines à 2–8 °C, en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière
- Milieu non supplémenté : 6 semaines à 2–8 °C à l'abri de la lumière

Section 5

Matériel requis non fourni

Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Plaque chauffante
- Balance, sensibilité 0,1 g
- Agitateur/homogénéisateur
- Étuve ou enceinte thermostatique, précision ± 1 °C
- Bain-marie

Produits

- Confirmation : *Campylobacter* Confirm Latex (n° de référence 3564297) ; Columbia Agar (n° de référence 3563784) ; iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR Kit (n° de référence 3578135) ; Oxidase Test (n° de référence 35934260) ; Physiological Sterile Water (n° de référence 3554164) ; Sterile Water (n° de référence 3554154)
- Milieu d'enrichissement pour la recherche : Bouillon de Bolton ou de Preston
- Diluant pour le dénombrement : Eau peptonée tamponnée, BPW Plus (n° de référence 3554179, 225 ml x 6 flacons ; 3564684, 500 g ; 3555790, 2 x 5 L poches ; 3555795, 4 x 3 L poches) ; BPW Standard (n° de référence 12013258, 5 kg ; 12013259, 500 g ; 12013260, 2 x 5 L poches) ; Tryptone-sel (n° de référence 3555754, 9 ml x 25 tubes ; 3555756, 225 ml x 6 flacons ; 3564544, 500 g ; 3555796, 3 L x 4 poches)
- Anses d'inoculation
- Boîtes de Pétri stériles (\varnothing 90 mm)
- Pipettes stériles
- Sacs de pesée stériles

Section 6

Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité

Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 7218). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses telles que les *Campylobacter*.
- Les milieux qui sont entrés en contact avec des échantillons alimentaires doivent être considérés comme contaminés et doivent être éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Ne pas exposer les boîtes de Pétri à la lumière.
- Après la préparation, laisser les boîtes de Pétri se stabiliser au moins 1 nuit à température ambiante.
- Les boîtes doivent être préséchées avant utilisation afin de prévenir l'excès d'humidité (EN ISO 7218). Par exemple, le séchage peut être effectué en plaçant les boîtes sous une hotte à flux laminaire (à température ambiante) pendant 20–30 min
- La confirmation de moins de 5 colonies comporte un risque de surestimation dû à la présence de colonies typiques qui ne seraient pas *Campylobacter* spp.

Limites d'utilisation

- Lors de l'étude NF VALIDATION, *Ralstonia mannitolytica* a produit des colonies typiques sur RAPID' *Campylobacter* après 48 hr d'incubation. Cette souche, rare dans les matrices alimentaires, est négative en confirmation. Elle présente une réaction d'agglutination atypique avec le test *Campylobacter* Confirm Latex, faible et d'apparence atypique (mucoïde/caillot) contrairement à l'agglutination typique particulière, granuleuse, homogène et dense.
- Lors de l'étude NF VALIDATION, il n'y a pas eu de croissance de *C. upsaliensis* sur RAPID' *Campylobacter* Agar.
- Si les colonies ne sont pas aisément dénombrables après 24 hr d'incubation, incuber de nouveau pendant 48 hr.
- En cas de résultats discordants (positif sur RAPID' *Campylobacter* Agar, négatif avec la méthode de confirmation), le laboratoire doit mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat.

Contrôle qualité

- Chaque produit fabriqué et commercialisé par Bio-Rad est soumis à une procédure d'assurance qualité à toutes les étapes, de la réception des matières premières jusqu'à la mise sur le marché du produit fini. Chaque lot de produits finis subit un contrôle qualité conforme à EN ISO 11133 et est mis sur le marché uniquement s'il satisfait aux critères d'acceptabilité. La documentation relative à la production et au contrôle qualité de chaque lot est archivée.
- Pour consulter la fiche de données de sécurité (FDS) et le certificat d'analyse, visiter www.bio-rad.com

Section 7 Protocole

Préparation du milieu de culture déshydraté

1. Toujours agiter le flacon avant utilisation.
2. Dissoudre 20 g de poudre dans 370 ml d'eau distillée et mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène.
3. Chauffer doucement en mélangeant fréquemment, puis amener à ébullition.
4. Stériliser en autoclave à 121 °C pendant 15 min.
5. Refroidir le milieu de culture à 47–50°C.
6. Réhydrater aseptiquement le supplément lyophilisé avec 30 ml d'eau distillée stérile. Mélanger jusqu'à dissolution complète.
7. Ajouter aseptiquement 1 flacon de supplément reconstitué. Bien mélanger et couler en boîtes de Pétri.
8. 500 g de poudre permettent de reconstituer 10 L de milieu.

Recherche des *Campylobacter* spp.

1. Dans le cadre de la méthode normalisée, suivre le protocole d'enrichissement décrit dans la norme ISO 10272-1:2017.
2. Dans le cadre d'une méthode alternative, diluer n g ou n ml d'échantillon dans $9 \times n$ ml de bouillon de Bolton ou de Preston. Par exemple, diluer 25 g ou 25 ml d'échantillon dans 225 ml de bouillon de Bolton ou de Preston pour obtenir une dilution au 1/10.
3. Homogénéiser avec un agitateur/homogénéisateur.
4. Incuber le bouillon de Bolton à 37 ± 1 °C pendant 4–6 hr puis à $41,5 \pm 1$ °C pendant 44 ± 4 hr en microaérophilie.
5. Incuber le bouillon de Preston à $41,5 \pm 1$ °C pendant 24 ± 2 hr en microaérophilie.
6. À l'aide d'une anse stérile, strier 10 µl de bouillon d'enrichissement sur RAPID'*Campylobacter* Agar.
7. Incuber la boîte couvercle vers le bas à $41,5 \pm 1$ °C pendant 24–48 hr en microaérophilie.
8. *Campylobacter* produit des colonies rouge brique sur RAPID'*Campylobacter* Agar.
9. Après l'étape d'incubation, les boîtes peuvent être stockées à 2–8 °C pendant 72 hr.

Dénombrement des *Campylobacter* spp.

1. Diluer n g ou n ml d'échantillon dans $9 \times n$ ml de bouillon (conformément à la norme ISO 10272-2 et ISO 6887). Si nécessaire, effectuer une dilution au 1:10e.
2. Étaler 0,1 ml de l'échantillon et/ou de ses dilutions décimales sur une boîte de petri. S'il est nécessaire de procéder à l'estimation de petits nombres, étaler 1 ml d'échantillon à la surface de 3 boîtes de 90 mm (~0,33 ml/boîte).
3. Incuber la boîte pendant 44 ± 4 hr à $41,5 \pm 1$ °C en microaérophilie.
4. *Campylobacter* produit des colonies rouge brique sur RAPID'*Campylobacter* Agar.
5. Après l'étape d'incubation, les boîtes peuvent être stockées à 2–8 °C pendant 72 hr.
6. Consulter la norme EN ISO 7218 pour obtenir des informations sur l'inoculation, le comptage des colonies, les calculs et l'expression des résultats.


Section 8 Confirmation des résultats positifs

1. Dans le contexte de la méthode normalisée, effectuer les tests de confirmation comme décrit dans la norme ISO 10272-1 ou ISO 10272-2.
2. Dans le contexte de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons identifiés comme positifs doivent être confirmés de l'une des façons suivantes :
 - a. À l'aide des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées ISO (y compris l'étape de purification).
 - b. À l'aide de sondes nucléiques comme décrit dans la norme ISO 7218 (par exemple, iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR Kit) avec des colonies isolées (avec ou sans étape de purification).
 - c. Exécution d'un test d'agglutination au latex à l'aide du test *Campylobacter* Confirm Latex.
 - d. Utilisation du test MALDI Biotyper (le système Biotyper de Bruker inclut un spectromètre de masse MALDI time-of-flight et MBT Compass version logicielle 4) directement à partir d'une colonie isolée ou après une étape de purification. Les informations d'identification sur le genre et/ou les espèces fournies par la solution complète MALDI Biotyper ne sont pas incluses dans le cadre de la marque NF VALIDATION.
3. En cas de résultats discordants (préssumé positif avec RAPID'*Campylobacter*, négatif avec la méthode de confirmation, particulièrement avec le test au latex), le laboratoire doit suivre les étapes nécessaires pour garantir la validité du résultat obtenu.

Section 9 Confirmation d'autres méthodes

Sans objet.

Section 10 Performance du test et validations

Certification	Domaine	Protocole de validation	Protocole de référence	Référence de certificat
NF VALIDATION	Produits carnés, volailles et produits à base de volaille, échantillons environnementaux	EN ISO 16140-2	ISO 10272-2:2017	 BRD : 07/25-01/14 MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR LE SECTEUR AGRO-ALIMENTAIRE Certifié par AFNOR Certification http://nf-validation.afnor.org/en

Section 11

Références

ISO 7218:2007/AMD1:2013 – Microbiologie des aliments - Exigences générales et recommandations

ISO 6887-1:2017 – Microbiologie de la chaîne alimentaire – Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique – Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

ISO 10272-1:2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp. — Partie 1 : Méthode de recherche.

ISO 10272-2:2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp. — Partie 2 : Technique par comptage des colonies.

United States Department of Agriculture (2016). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 41.04: Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0273bc3d-2363-45b3-befb-1190c25f3c8b/MLG-41.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 9, 2020.

Section 12 Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Novembre 2020	10000132429 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Modification importante - Nouvelle conception de document - Modification du numéro de document (version précédente RAPID_Campylobacter_V04_20 août 2019)
Novembre 2021	10000132429 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Précision du protocole de séchage des boîtes - Précision du protocole d'inoculation pour le dénombrement - Mise à jour des références

Visitez www.bio-rad.com/rapidmedia pour plus d'informations sur la gamme complète de milieux chromogènes RAPID.

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK est une marque déposée de Bio-Rad Europe GmbH dans certaines circonscriptions.

Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23
Mexico 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280
Norway 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188
South Africa 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23
Switzerland 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0122



10000132429 Ver B US/EG

RAPID'*Campylobacter* Agar

Anwenderhandbuch

Chromogenes Medium zum Nachweis und zur Zählung der wichtigsten thermophilen *Campylobacter*-Spezies (*C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*) in Lebensmitteln und Umgebungsproben

Katalog-Nr. 12012036, gebrauchsfertige Agarplatten, 20 Agarplatten x 90 mm

Katalog-Nr. 3564295, dehydriert, 500 g

Katalog-Nr. 3564296, Supplement, gefriergetrocknet, 10 Fläschchen



BIO-RAD

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1	Einleitung	1
Abschnitt 2	Funktionsprinzip von RAPID' <i>Campylobacter</i>	1
Abschnitt 3	Theoretische Zusammensetzung	1
Abschnitt 4	Haltbarkeit und Lagerung	1
Abschnitt 5	Zusätzlich benötigtes Material	2
	Geräte	2
	Zubehör	2
Abschnitt 6	Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle	3
Abschnitt 7	Protokoll	4
	Vorbereitung des dehydrierten Mediums.....	4
	Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp.....	4
	Zählung von <i>Campylobacter</i> spp.	5
Abschnitt 8	Bestätigung positiver Ergebnisse	5
Abschnitt 9	Bestätigung anderer Methoden	6
Abschnitt 10	Testleistung und Testvalidierungen	6
Abschnitt 11	Literatur	7
Abschnitt 12	Revisionshistorie	8

Abschnitt 1 Einleitung

Campylobacter, insbesondere die Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*, hat sich zu einer der häufigsten Ursachen von Gastroenteritis beim Menschen entwickelt. Da die Bakterien im Darmtrakt von Rindern, Schafen, Schweinen und Vögeln vorkommen, können Nahrungsmittel tierischer Herkunft kontaminiert sein. Die meisten *Campylobacter* Infektionen treten durch den Verzehr von kontaminiertem Wasser, Rohmilch und unzureichend pasteurisierter Milch sowie unzureichend gegartem Fleisch, insbesondere Geflügel, auf. Für eine Infektion mit *Campylobacter* sind vermutlich bereits 500 Bakterien ausreichend. Die epidemiologische Überwachung zeigt, dass jedes Jahr Millionen von Menschen mit *Campylobacter* infiziert werden. Daher haben Tests auf das Vorhandensein von *Campylobacter* in Lebensmitteln und im Umfeld der Verarbeitung einen hohen Stellenwert. Chromogene Substrate in Kulturmedien erleichtern die Verwendung der Medien mit Ergebnissen, die auf einem Farbumschlag aufgrund enzymatischer Reaktionen beruhen.

Abschnitt 2 Funktionsprinzip von RAPID'*Campylobacter*

Die Verwendung einer selektiven Nährstoffmischung in Verbindung mit einem Reduktionsmittel ermöglicht das Wachstum von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in einem optimalen Zeitraum. Das Wachstum anderer Bakterienarten sowie das von Hefen und Schimmelpilze werden durch die selektiven Agenzien gehemmt. *Campylobacter* bildet auf RAPID'*Campylobacter* ziegelrote Kolonien.

Abschnitt 3 Theoretische Zusammensetzung

Nährstoffmischung	28,5 g
Selektive Agenzien	0,082 g
Chromogenes Substrat	0,05 g
Reduktionsmischung	1 g
Natriumchlorid	5 g
Puffer	1,25 g
Agar	14 g
Destilliertes Wasser	qsp 1.000 ml

Finaler pH-Wert bei 25°C = 7,2–7,5

Abschnitt 4 Haltbarkeit und Lagerung

- Dehydriert: Trocken und lichtgeschützt in der sorgfältig verschlossenen Packung bei 15–25°C.
- Supplement: Lichtgeschützt bei 2–8°C
- Gebrauchsfertige Agarplatten: Lichtgeschützt bei 2–8°C
- Aus dehydriertem Basismedium hergestellte Agarplatten: 2 Wochen bei trockener und lichtgeschützter Lagerung in der sorgfältig verschlossenen Packung bei 2–8°C.
- Medium ohne Supplement: 6 Wochen lichtgeschützt bei 2–8°C

Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Heizplatte
- Waage, bis auf 0,1 g genau
- Rührer / Homogenisator
- Thermostatisch kontrollierter Inkubator oder Inkubationskammer, bis auf $\pm 1^\circ\text{C}$ genau
- Wasserbad

Zubehör

- Bestätigung: *Campylobacter* Confirm Latex (Katalog-Nr. 3564297); Columbia Agar (Katalog-Nr. 3563784); iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR Kit (Katalog-Nr. 3578135); Oxidase-Test (Katalog-Nr. 35934260); physiologisches steriles Wasser (Katalog-Nr. 3554164); steriles Wasser (Katalog-Nr. 3554154)
- Anreicherungsmedium für den Nachweis: Bolton- oder Preston-Nährbouillon
- Verdünnungsmittel zum Zählen: Gepuffertes Peptonwasser (GPW; Buffered Peptone Water, BPW Plus (Katalog-Nr. 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; 3564684, 500 g; 3555790, 2 Beutel x 5 L; 3555795, 4 Beutel x 3 L)); (GPW; Buffered Peptone Water, BPW Standard (Katalog-Nr. 12013258, 5 kg; 12013259, 500 g; 12013260, 2 Beutel x 5 L)); Tryptonsalz (Katalog-Nr. 3555754, 25 Röhrchen x 9 ml; 3555756, 6 Flaschen x 225 ml; 3564544, 500 g; 3555796, 4 Beutel x 3 L)
- Impfösen
- Sterile Petrischalen (90 mm)
- Sterile Pipetten
- Sterile Probenbeutel

Abschnitt 6

Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle

Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis zu beachten (EN ISO 7218). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen, lebenden Bakterien wie *Campylobacter* sollten angemessene Schutzvorkehrungen getroffen werden (zum Beispiel Handschuhe und Laborkittel tragen).
- Medien, die mit Lebensmittelproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und gemäß den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen zu entsorgen.
- Die Petrischalen lichtgeschützt aufbewahren.
- Die Petrischalen nach der Zubereitung mindestens 1 Nacht bei Raumtemperatur stabilisieren lassen.
- Die Platten sollten vor Gebrauch getrocknet werden, sodass sie frei von überschüssiger Feuchtigkeit sind (EN ISO 7218). Platten können beispielsweise getrocknet werden, indem sie mit dem Agar nach oben für 20–30 min in ein Laminarflow-Kabinett gelegt werden (Raumtemperatur)
- Die Bestätigung von weniger als 5 Kolonien birgt das Risiko einer überschätzten Bewertung, da es sich um typische Kolonien anderer Keime als *Campylobacter* spp. handeln könnte.

Anwendungsbeschränkungen

- In der NF VALIDATION-Studie bildete *Ralstonia mannitolytica* nach 48-stündiger Inkubation typische Kolonien auf RAPID'*Campylobacter*. Dieser Stamm kommt in Nahrungsmitteln selten vor und ist als negatives Ergebnis zu werten. Er führt mit *Campylobacter* Confirm Latex zu einer schwachen Agglutinationsreaktion mit atypischem Aussehen (mukoid, flockig). Die normale Partikelagglutination ist dagegen granulär, homogen und dicht.
- In der NF VALIDATION-Studie war kein Wachstum von *C. upsaliensis* auf RAPID'*Campylobacter* Agar festzustellen.
- Wenn nach 24-stündiger Inkubation keine leicht zählbaren Kolonien vorhanden sind, sollte die Platte erneut inkubiert werden (insgesamt 48 Stunden).
- Bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen (positiv auf RAPID'*Campylobacter*, negativ mit der Bestätigungsmethode) muss das Labor die erforderlichen Schritte ausführen, um die Validität des erhaltenen Ergebnisses sicherzustellen.

Qualitätskontrolle

- Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte einer umfassenden Qualitätssicherung. Jede Charge des fertigen Produkts wird einer Qualitätskontrolle gemäß EN ISO 11133 unterzogen und gelangt nur dann in den Vertrieb, wenn sie die Akzeptanzkriterien erfüllt. Die Unterlagen zur Produktion und Qualitätskontrolle jeder Charge werden archiviert.
- Das Sicherheitsdatenblatt und das Analysezertifikat für das Produkt sind im Internet auf www.bio-rad.com erhältlich.

Abschnitt 7 Protokoll

Vorbereitung des dehydrierten Mediums

1. Den Behälter vor jedem Gebrauch schütteln.
2. 20 g Pulver werden in 370 ml destilliertem Wasser gelöst und zu einer homogenen Suspension gemischt.
3. Unter ständigem Rühren vorsichtig erhitzen und zum Kochen bringen.
4. In einem Autoklaven 15 min bei 121°C sterilisieren.
5. Das Medium auf 47–50°C abkühlen lassen.
6. Das lyophilisierte Supplement mit 30 ml sterilem destilliertem Wasser unter sterilen Bedingungen (aseptisch) rehydrieren. Rühren, bis es sich vollständig aufgelöst hat.
7. Unter sterilen Bedingungen (aseptisch) 1 Fläschchen rekonstituiertes Supplement zugeben. Gut mischen und in Petrischalen gießen.
8. 500 g Pulver ergeben 10 L Medium.

Nachweis von *Campylobacter* spp.

1. Für die Standardmethode ist das in ISO 10272-1:2017 beschriebene Anreicherungsprotokoll zu befolgen.
2. Alternativ n g oder n ml Probe in $9 \times n$ ml Bolton- oder Preston-Nährbouillon verdünnen. Zum Beispiel 25 g bzw. 25 ml Probe in 225 ml Bolton- oder Preston-Nährbouillon verdünnen, um eine Verdünnung von 1:10 zu erhalten.
3. Mit dem Rührer/Homogenisator homogenisieren.
4. Die Bolton-Nährbouillon 4 bis 6 hr bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$, dann 44 ± 4 hr bei $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ in einer mikroaerophilen Umgebung inkubieren.
5. Die Preston-Nährbouillon 24 ± 2 hr bei $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ in einer mikroaerophilen Umgebung inkubieren.
6. Mit einer sterilen Impföse 10 μl Anreicherungsbouillon auf RAPID'*Campylobacter* Agar ausstreichen.
7. Die Platte umgedreht 24 bis 48 hr bei $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ in einer mikroaerophilen Atmosphäre inkubieren.
8. *Campylobacter* bildet auf RAPID'*Campylobacter* Agar ziegelrote Kolonien.
9. Nach der Inkubation können die Platten für 72 hr bei 2–8°C gelagert werden.

Zählung von *Campylobacter* spp.

1. n g bzw. n ml Probe in $9 \times n$ ml Nährbouillon verdünnen (gemäß ISO 10272-2 und ISO 6887). Wenn nötig, eine 1:10 Verdünnung erstellen.
2. 0,1 ml der Probe und/oder eine der dezimalen Verdünnungsstufe auf einer Platte ausstreichen. Wenn niedrige Zellzahlen bestimmt werden sollen, 1 ml der Probe auf drei 90 mm Platten ausstreichen (~0,33 ml/Platte).
3. Die Platte für 44 ± 4 hr bei $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ in einer mikroaerophilen Umgebung inkubieren.
4. *Campylobacter* bildet auf RAPID'*Campylobacter* Agar ziegelrote Kolonien.
5. Nach der Inkubation können die Platten für 72 hr bei $2-8^\circ\text{C}$ gelagert werden.
6. Die Norm EN ISO 7218 enthält Informationen zum Beimpfen, Zählen von Kolonien sowie zum Berechnen und Angeben der Ergebnisse.


Abschnitt 8 Bestätigung positiver Ergebnisse

1. Im Rahmen der Standardmethode Bestätigungstests durchführen, wie es in den Normen ISO 10272-1 oder ISO 10272-2 beschrieben ist.
2. Im Rahmen einer NF-Validierung müssen alle als positiv identifizierten Proben mit einer der folgenden Methoden bestätigt werden:
 - a. Mit den in den ISO-Normen beschriebenen herkömmlichen Tests (einschließlich des Reinigungsschritts).
 - b. Durch Verwendung von Nukleinsonden wie in der Norm ISO 7218 beschrieben (z. B. iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR-Kit) unter Verwendung von Einzelkolonien (mit oder ohne Reinigungsschritt).
 - c. Mit einem Latexagglutinationstest mit dem *Campylobacter* Confirm Latex.
 - d. Durch Anwendung des MALDI Biotyper Tests (das Biotyper-System von Bruker umfasst ein MALDI-Flugzeit-Massenspektrometer und die MBT Compass-Software, Version 4) direkt mit einer isolierten Kolonie oder nach einem Reinigungsschritt. Die mit der MALDI Biotyper Complete Solution erhaltenen Informationen zur Identifizierung der Gattung und/oder Art werden im Zusammenhang mit der Erteilung der NF VALIDATION-Zertifizierung nicht berücksichtigt.
3. Bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen (vermutlich positiv auf RAPID'*Campylobacter*, negativ mit der Bestätigungsmethode und insbesondere beim Latex-Test) muss das Labor die erforderlichen Schritte ausführen, um die Validität des erhaltenen Ergebnisses sicherzustellen.

Abschnitt 9 Bestätigung anderer Methoden

Nicht zutreffend

Abschnitt 10 Testleistung und Testvalidierungen

Zertifizierungsstelle	Umfang	Validierungsprotokoll	Referenzprotokoll	Zertifikat-Referenz
NF VALIDATION	Fleischerzeugnisse, Geflügel und Geflügelerzeugnisse und Umgebungsproben	EN ISO 16140-2	ISO 10272-2:2017	 BRD: 07/25-01/14 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Zertifiziert durch die AFNOR- Zertifizierungsstelle http://nf-validation.afnor.org/en

Abschnitt 11 Literatur

ISO 7218:2007/AMD1:2013 – Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen

ISO 6887-1:2017 – Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen – Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen

ISO 10272-1:2017. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Campylobacter* spp. — Teil 1: Nachweisverfahren.

ISO 10272-2:2017. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Campylobacter* spp. — Teil 2: Koloniezählverfahren

United States Department of Agriculture (2016). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 41.04: Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0273bc3d-2363-45b3-befb-1190c25f3c8b/MLG-41.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 9, 2020.

Abschnitt 12 Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
November 2020	10000132429 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Bedeutende Änderung - Neues Dokumentdesign - Änderung der Dokumentnummer (vorhergehende Version RAPID_Campylobacter_V04_20. August 2019)
November 2021	10000132429 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Klarstellung des Protokolls zum Trocknen der Platten - Klarstellung des Protokolls zur Inokulation bei Zählung - Literatur (aktualisiert)

Weitere Informationen über unser vollständiges Angebot an chromogenen RAPID Medien finden Sie bei uns im Internet auf www.bio-rad.com/rapidmedia

BIO-RAD ist eine Marke der Bio-Rad Laboratories, Inc.
 iQ-Check ist in bestimmten Ländern eine Marke der Bio-Rad Europe GmbH.
 Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23
Mexico 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280
Norway 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188
South Africa 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23
Switzerland 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0122



10000132429 Ver B US/EG

RAPID'*Campylobacter* Agar

Manuale utente

Terreno cromogenico per la ricerca e la conta delle specie principali di *Campylobacter* termofilo (*C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*) in prodotti alimentari e campioni ambientali

Catalogo #12012036, piastre preparate, 90 mm x 20 piastre

Catalogo #3564295, disidratato, 500 g

Catalogo #3564296, supplemento, liofilizzato, 10 fiale



BIO-RAD

Indice

Sezione 1	Introduzione	1
Sezione 2	RAPID' <i>Campylobacter</i> - Principio	1
Sezione 3	Formula teorica	1
Sezione 4	Durata e conservazione	1
Sezione 5	Materiali necessari ma non forniti	2
	Apparecchiatura	2
	Materiali	2
Sezione 6	Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità	3
Sezione 7	Protocollo	4
	Preparazione del terreno disidratato	4
	Ricerca di <i>Campylobacter</i> spp.	4
	Conta di <i>Campylobacter</i> spp.....	5
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi	5
Sezione 9	Conferma di altri metodi	6
Sezione 10	Performance del test e validazioni	6
Sezione 11	Riferimenti	7
Sezione 12	Cronologia delle revisioni	8

Sezione 1 Introduzione

Il *Campylobacter* è risultato essere la causa più frequente di gastroenterite negli esseri umani. *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* sono le specie più comunemente identificate come causa di infezione nell'uomo. I batteri vivono nel tratto intestinale di bovini, ovini, suini e uccelli; di conseguenza gli alimenti di origine animale possono essere contaminati. La maggior parte delle infezioni da *Campylobacter* è contratta con il consumo di acqua contaminata, latte crudo non adeguatamente pastorizzato e carni poco cotte, in particolare il pollame. Si ritiene che la dose infettiva di *Campylobacter* sia di soli 500 batteri. La sorveglianza indica che ogni anno milioni di persone vengono infettate da *Campylobacter*. L'esame per rilevare la presenza di *Campylobacter* nei prodotti alimentari e nell'ambiente di lavorazione degli alimenti costituisce una pratica importante. L'uso di substrati cromogenici nei terreni di coltura ne aumenta la facilità d'uso con risultati basati su mutamenti di colore dovuti a reazioni enzimatiche.

Sezione 2 RAPID'*Campylobacter* - Principio

L'uso di una miscela nutritiva selezionata, associata ad agente riducente, consente la crescita di *Campylobacter* spp. termoresistenti in un periodo di tempo ottimale. Altre specie di batteri, oltre a lieviti e muffe, sono inibiti dagli agenti selettivi. Su RAPID'*Campylobacter* il batterio genera colonie di colore rosso mattone.

Sezione 3 Formula teorica

Miscela nutritiva	28,5 g
Agenti selettivi	0,082 g
Miscela cromogenica	0,05 g
Miscela riducente	1 g
Cloruro di sodio	5 g
Tampone	1,25 g
Agar	14 g
Acqua distillata	qs 1.000 ml

pH finale a 25°C = 7,2-7,5

Sezione 4 Durata e conservazione

- Disidratato: 15-25°C in una confezione accuratamente sigillata, in un luogo asciutto e buio
- Supplemento: 2-8°C in un luogo buio
- Preparato: 2-8°C in un luogo buio
- Piastra preparata da base disidratata: 2 settimane a 2-8°C in una confezione accuratamente sigillata, in un luogo asciutto e buio
- Terreno non supplementato: 6 settimane a 2-8°C in un luogo buio

Sezione 5

Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Piastra riscaldante
- Bilancia, sensibilità di 0,1 g
- Agitatore/omogeneizzatore
- Incubatore o camera di incubazione con controllo termostatico, con precisione di $\pm 1^{\circ}\text{C}$
- Bagnomaria

Materiali

- Conferma: *Campylobacter* Confirm Latex (catalogo #3564297); Columbia Agar (catalogo #3563784); kit iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR (catalogo #3578135); test dell'ossidasi (catalogo #35934260); soluzione fisiologica sterile (catalogo #3554164); acqua sterile (catalogo #3554154)
- Terreno di arricchimento per la ricerca: brodo Bolton o Preston
- Diluente per la conta: Acqua peptonata tamponata (APT), BPW Plus (catalogo #3554179, 225 ml x 6 flaconi; 3564684, 500 g; 3555790, 2 x 5 L sacche; 3555795, 4 x 3 L sacche); BPW Standard (catalogo #12013258, 5 kg; 12013259, 500 g; 12013260, 2 x 5 L sacche); sale triptone (catalogo #3555754, 9 ml x 25 provette; 3555756, 225 ml x 6 flaconi; 3564544, 500 g; 3555796, 3 L x 4 sacche)
- Anse per inoculazione
- Piastre di Petri sterili (90 mm)
- Pipette sterili
- Sacche di pesatura sterili

Sezione 6

Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità

Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 7218). Indossare protezioni adeguate, quali guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi come il *Campylobacter*
- I terreni entrati in contatto con campioni di prodotti alimentari devono essere considerati contaminati e quindi smaltiti in conformità con normative e direttive locali
- Non esporre alla luce le piastre di Petri
- Dopo la preparazione, lasciare stabilizzare le piastre di Petri per almeno 1 notte a temperatura ambiente
- Le piastre devono essere asciugate per evitare un eccesso di umidità (EN ISO 7218). Per esempio possono essere asciugate ponendole con la superficie agarizzata verso l'alto in una cappa a flusso laminare(a temperatura ambiente) per 20–30 min
- Confermare meno di 5 colonie comporta il rischio di sovrastima a causa della presenza di colonie tipiche che potrebbero non essere *Campylobacter* spp.

Limitazioni d'uso

- Durante lo studio di VALIDAZIONE NF, la *Ralstonia mannitolytica* ha prodotto colonie tipiche su RAPID'*Campylobacter* dopo 48 hr di incubazione. Questo ceppo, che si trova raramente in matrici alimentari, genera una conferma negativa. Produce una reazione di agglutinazione atipica con *Campylobacter* Confirm Latex, debole e atipica nell'aspetto (mucoide/cagliato) piuttosto che la normale agglutinazione di particolato, granulosa, omogenea e densa
- Durante lo studio di VALIDAZIONE NF, il *C. upsaliensis* non è riuscito a crescere sull'agar RAPID'*Campylobacter*
- Se la conta delle colonie non risulta semplice dopo 24 hr di incubazione, incubare nuovamente la piastra per un totale di 48 hr
- In caso di risultati discordanti (positivo su RAPID'*Campylobacter*, negativo con il metodo di conferma), il laboratorio deve implementare risorse sufficienti a garantire la validità del risultato

Controllo qualità

- Tutti i prodotti fabbricati e commercializzati dalla società Bio-Rad sono sottoposti a un sistema di assicurazione qualità in ogni fase, dal momento del ricevimento delle materie prime fino alla commercializzazione dei prodotti finiti. Ciascun lotto di prodotto finito è soggetto a un controllo qualità conformemente alla norma EN ISO 11133 e viene messo in commercio solo se risulta conforme ai criteri di accettazione. La documentazione relativa alla produzione e al controllo qualità di ogni lotto è conservata su file.
- Per informazioni sulla sicurezza del prodotto (schede dati di sicurezza) e il certificato di analisi, visitare il sito www.bio-rad.com.

Sezione 7 Protocollo

Preparazione del terreno disidratato

1. Agitare sempre il flacone prima dell'uso.
2. Dissolvere 20 g di polvere in 370 ml di acqua distillata e miscelare fino a ottenere una sospensione omogenea.
3. Riscaldare lentamente, agitando spesso, quindi portare a ebollizione.
4. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.
5. Raffreddare il terreno a 47-50°C.
6. Reidratare in condizioni asettiche il supplemento liofilizzato con 30 ml di acqua distillata sterile. Agitare fino al completo scioglimento.
7. Aggiungere 1 fiala di supplemento ricostituito in condizioni asettiche. Miscelare accuratamente e versare nelle piastre di Petri.
8. Un flacone di polvere da 500 g produce 10 L di terreno.

Ricerca di *Campylobacter* spp.

1. Per il metodo standard, seguire il protocollo di arricchimento descritto nella norma ISO 10272-1:2017.
2. Per un metodo alternativo, diluire n g o n ml di campione in $9 \times n$ ml di brodo Bolton o Preston. Ad esempio, diluire 25 g o 25 ml di campione in 225 ml di brodo Bolton o Preston per ottenere una diluizione 1:10.
3. Omogeneizzare con un agitatore/omogeneizzatore.
4. Incubare il brodo Bolton a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 4–6 hr, quindi a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ per 44 ± 4 hr in atmosfera microaerofila.
5. Incubare il brodo Preston a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 hr in atmosfera microaerofila.
6. Utilizzando un'ansa sterile, strisciare 10 μl di brodo di arricchimento sull'agar RAPID'*Campylobacter*.
7. Incubare la piastra con il coperchio abbassato a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24–48 hr in atmosfera microaerofila.
8. Sull'agar RAPID'*Campylobacter* il batterio forma colonie di colore rosso mattone.
9. Al termine della fase di incubazione, le piastre possono essere conservate a 2-8°C per 72 hr.

Conta di *Campylobacter* spp.

1. Diluire n g o n ml di campione in $9 \times n$ ml di brodo (conformemente alla norma ISO 10272-2 e ISO 6887). Se necessario, effettuare una diluizione 1:10.
2. Piastrare 0,1 ml di campione e/o le sue diluizioni decimali in un'piastra di Petri. Se è necessario stimare piccoli numeri, piastrare 1 ml di campione su 3 piastre da 90mm (~0.33 ml/piastra).
3. Incubare la piastra per 44 ± 4 hr a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ in atmosfera microaerofila.
4. Sull'agar RAPID'*Campylobacter* il batterio forma colonie di colore rosso mattone.
5. Al termine della fase di incubazione, le piastre possono essere conservate a $2-8^\circ\text{C}$ per 72 hr.
6. Fare riferimento alla norma EN ISO 7218 per l'inoculazione, la conta delle colonie, il calcolo e l'espressione dei risultati.


Sezione 8 Conferma dei risultati positivi

1. Nell'ambito del metodo standard, eseguire i test di conferma come descritto nella norma ISO 10272-1 o ISO 10272-2.
2. Nell'ambito della VALIDAZIONE NF, tutti i campioni identificati come positivi devono essere confermati in uno dei seguenti modi:
 - a. Utilizzando i test convenzionali descritti nei metodi standard ISO (inclusa la fase di purificazione).
 - b. Mediante sonde nucleiche, come descritto nella norma ISO 7218 (ad esempio, il kit iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR) utilizzando colonie isolate (con o senza fase di purificazione).
 - c. Eseguendo un test di agglutinazione al lattice tramite il *Campylobacter* Confirm Latex.
 - d. Utilizzando il test MALDI Biotyper (il sistema Biotyper di Bruker include uno spettrometro di massa a tempo di volo MALDI e il software MBT Compass, versione 4) direttamente da una colonia isolata o dopo una fase di purificazione. Le informazioni sull'identificazione del genere e/o della specie fornite dalla soluzione completa MALDI Biotyper non sono incluse nell'ambito del marchio NF VALIDATION.
3. In caso di risultati discordanti (presunto positivo con RAPID' *Campylobacter*, negativo con metodo di conferma, in particolare con il test al lattice), il laboratorio deve seguire le fasi necessarie per garantire la validità del risultato ottenuto.

Sezione 9 Conferma di altri metodi

Non applicabile.

Sezione 10 Performance del test e validazioni

Certificazione	Ambito di applicazione	Protocollo di validazione	Protocollo di riferimento	Riferimento al certificato
VALIDAZIONE NF	Prodotti a base di carne, pollame e prodotti a base di pollame, e campioni ambientali	EN ISO 16140-2	ISO 10272-2:2017	 BRD: 07/25-01/14 METODI ANALITICI ALTERNATIVI PER IL SETTORE AGROALIMENTARE Certificato mediante certificazione AFNOR http://nf-validation.afnor.org/en

Sezione 11

Riferimenti

ISO 7218:2007/AMD1:2013 – Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche

ISO 6887-1:2017 – Microbiologia della catena alimentare – Preparazione dei campioni di prova, della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali per l'analisi microbiologica – Parte 1: Regole generali per la preparazione della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali

ISO 10272-1:2017. Microbiologia della catena alimentare — Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Campylobacter* spp. — Parte 1: Metodo per la ricerca.

ISO 10272-2:2017. Microbiologia della catena alimentare — Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Campylobacter* spp. — Parte 2: Metodo per la conta delle colonie.

United States Department of Agriculture (2016). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 41.04: Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0273bc3d-2363-45b3-befb-1190c25f3c8b/MLG-41.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 9, 2020.

Sezione 12 Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero documento	Modifica
Novembre 2020	10000132429 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Modifica importante - Nuovo design del documento - Modifica numero documento (versione precedente RAPID_Campylobacter_V04_20 agosto 2019)
Novembre 2021	10000132429 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Chiarimento sul processo di asciugatura delle paistre - Chiarimento sul protocollo di inoculo per la conta - Aggiornamento della letteratura

Per ulteriori informazioni sulla nostra gamma completa di terreni cromogenici RAPID[®], visitare il sito www.bio-rad.com/rapidmedia.

Bio-Rad è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK è un marchio registrato di Bio-Rad Europe GMBH in determinate giurisdizioni.

Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà dei rispettivi titolari.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23
Mexico 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280
Norway 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188
South Africa 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23
Switzerland 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0122



10000132429 Ver B US/EG

RAPID'*Campylobacter* Agar

Guia do usuário

Meios cromogênicos para a detecção e enumeração das principais espécies de *Campylobacter* termófila (*C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*) em produtos alimentícios e em amostras ambientais

Nº do catálogo 12012036, Meios de cultura preparados, 90 mm x 20 placas

Nº do catálogo 3564295, Desidratado, 500 g

Nº do catálogo 3564296, Suplemento, liofilizado ~~congelar seco~~, 10 frascos



BIO-RAD

Índice

Seção 1	Introdução	1
Seção 2	Princípio RAPID' <i>Campylobacter</i>	1
Seção 3	Fórmula Teórica.....	1
Seção 4	Prazo de validade e armazenamento	1
Seção 5	Materiais necessários, mas não fornecidos.....	2
	Equipamento	2
	Suprimentos.....	2
Seção 6	Precauções, limitações de uso e controle de qualidade	3
Seção 7	Protocolo	4
	Preparação do Meio Desidratado.....	4
	Detecção de <i>Campylobacter</i> spp.	4
	Contagem de <i>Campylobacter</i> spp.....	5
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos.....	5
Seção 9	Confirmação de outros métodos.....	6
Seção 10	Desempenho e validação do teste	6
Seção 11	Referências	7
Seção 12	Histórico de Revisão	8

Seção 1 Introdução

A *Campylobacter* destacou-se como a mais frequente causa de gastroenterite em humanos. A *C. jejuni*, a *C. coli* e a *C. lari* são as espécies mais comumente identificadas como causadoras de infecção em humanos. As bactérias vivem no trato intestinal de bovinos, ovinos, suínos e aves e, conseqüentemente, os alimentos de origem animal podem ser contaminados. A maioria das infecções por *Campylobacter* são adquiridas através do consumo de água contaminada, leite cru e inadequadamente pasteurizado e carne malpassada, especialmente de aves. Acredita-se que a dosagem infecciosa de *Campylobacter* é bem baixa, em torno de 500 bactérias. A observação indica que milhões de pessoas são infectadas pelo *Campylobacter* a cada ano. O teste da presença de *Campylobacter* nos alimentos e no ambiente de processamento é uma prática importante. O uso de substratos cromogênicos em meios de cultura aumenta a facilidade de uso dos meios com resultados baseados em mudanças de cor causadas por reações enzimáticas.

Seção 2 Princípio RAPID'*Campylobacter*

O uso de uma mistura nutritiva selecionada associada ao agente redutor permite o crescimento do *Campylobacter* spp. termotolerante em um tempo ideal. Outras espécies bacterianas, assim como leveduras e bolores, são inibidas pelos agentes seletivos. *Campylobacter* produz colônias vermelhas no RAPID'*Campylobacter*.

Seção 3 Fórmula Teórica

Mistura nutritiva	28,5 g
Agentes seletivos	0,082 g
Mistura cromogênica	0,05 g
Mistura de redução	1 g
Cloreto de sódio	5 g
Tampão	1,25 g
Ágar	14 g
Água destilada	qsp 1.000 ml

pH final a 25°C = 7,2–7,5

Seção 4 Prazo de validade e armazenamento

- Desidratado: 15–25°C em embalagem cuidadosamente vedada, em um ambiente seco e arejado
- Suplemento: 2–8°C em local escuro
- Pré-distribuído: 2–8°C em local escuro
- Meio de cultura preparado a partir da base do desidratado: 2 semanas a 2–8°C em embalagem cuidadosamente vedada, em um ambiente seco e arejado
- Meio não-suplementado: 6 semanas a 2–8°C em local escuro

Seção 5

Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Placa de aquecimento
- Escala, sensibilidade de 0,1 g
- Misturador/homogeneizador
- Incubadora ou sala de incubação controlada termostaticamente, com precisão de $\pm 1^\circ\text{C}$
- Lavagem em água

Suprimentos

- Confirmação: *Campylobacter* Confirm Latex (nº do catálogo 3564297); Columbia Ágar (nº catálogo 3563784); Kit iQ-Check *Campylobacter* PCR em tempo real (nº do catálogo 3578135); Teste de oxidase (nº do catálogo 35934260); Água esterilizada fisiológica (nº do catálogo 3554164); Água esterilizada (nº do catálogo 3554154)
- Meio de enriquecimento para detecção: Caldo Bolton ou Preston
- Diluente para enumeração: Água peptonada tamponada, BPW Plus (nº do catálogo 3554179, 225 ml x 6 frascos; 3564684, 500 g; 3555790, sacos de 2 x 5 L; 3555795, sacos de 4 x 3 L); BPW padrão (catálogo #12013258, 5 kg; 12013259, 500 g; 12013260, sacos de 2 x 5 L); sal de triptona (catálogo #3555754, 9 ml x 25 tubos; 3555756, 225 ml x 6 frascos; 3564544, 500 g; 3555796, sacos de 3 L x 4)
- Inoculação de loops
- Placas de Petri estéreis (90 mm)
- Pipetas estéreis
- Sacos de pesagem estéreis

Seção 6

Precauções, limitações de uso e controle de qualidade

Precauções

- Respeite as boas práticas de laboratório (EN ISO 7218). É necessário o uso de proteção adequada, como luvas e jalecos, ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas, como a *Campylobacter*
- O meio que entrou em contato com amostras de alimentos deve ser considerado contaminado e descartado de acordo com as regras e regulamentos locais
- Não exponha placas de Petri à luz
- Após o preparo, deixar as placas de Petri estabilizarem por pelo menos 1 noite à temperatura ambiente
- As placas devem ser pré secas a fim de garantir que não apresentarão excesso de umidade (EN ISO 7218). Por exemplo: placas podem ser secas colocando-as com a superfície contendo ágar para cima em um fluxo laminar (temperatura ambiente por 20–30 min)
- A confirmação de menos de 5 colônias envolve o risco de fazer uma superestimação devido à presença de colônias típicas que podem não ser *Campylobacter* spp.

Limitações de uso

- Durante o estudo da NF VALIDATION, *Ralstonia mannitolytica* produziu colônias típicas em RAPID'*Campylobacter* após 48 h de incubação. Esta deformação, raramente encontrada em matrizes alimentares, dá uma confirmação negativa. Dá uma reação atípica de aglutinação com *Campylobacter* Confirm Latex, de aparência fraca e atípica (mucóide/curdo) em vez da aglutinação normal de partículas, granulosa, homogênea e densa
- Durante o estudo NF VALIDATION, *C. upsaliensis* não pode crescer em RAPID'*Campylobacter* ágar
- Se as colônias não forem facilmente contabilizadas após 24 hr de incubação, volte a incubar a placa por um total de 48 hr
- Em caso de resultados discordantes (positivos no RAPID'*Campylobacter*, negativos no método de confirmação), o laboratório deve implementar recursos suficientes para garantir a validade do resultado

Controle de qualidade

- Todos os produtos fabricados e comercializados pela Bio-Rad estão sujeitos aos procedimentos de garantia de qualidade em todas as etapas, desde a recepção da matéria-prima até a comercialização do produto final. Cada lote de produto acabado passa por um controle de qualidade de acordo com a EN ISO 11133 e é comercializado apenas quando satisfaz os critérios de aceitabilidade. A documentação relativa à produção e ao controle de qualidade de cada lote é mantida arquivada.
- Para informações de segurança do produto SDS e certificado de análise, visite www.bio-rad.com.

Seção 7 Protocolo

Preparação do Meio Desidratado

1. Agite sempre a garrafa antes de usar.
2. Dissolva 20 g de pó em 370 ml de água destilada e misture até obter uma suspensão homogênea.
3. Aqueça delicadamente, agitando com frequência, e deixe ferver.
4. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 min.
5. Resfrie o meio até 47–50°C.
6. Reidrate asépticamente o suplemento liofilizado com 30 ml de água destilada estéril. Mexa até a completa dissolução.
7. Adicione asépticamente 1 ampola de suplemento reconstituído. Misture bem e despeje em placas de Petri.
8. Um frasco de 500 g de pó produz 10 L de meio.

Detecção de *Campylobacter* spp.

1. Para o método padrão, siga o protocolo de enriquecimento descrito na ISO 10272-1:2017.
2. Para método alternativo, dilua n g ou n ml de amostra em $9 \times n$ ml de caldo Bolton ou caldo Preston. Por exemplo, dilua 25 g ou 25 ml de amostra em 225 ml de caldo Bolton ou Preston para obter uma diluição de 1/10.
3. Uniformize com o misturador/homogeneizador.
4. Incube o caldo Bolton a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4-6 hr e depois a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 44 ± 4 hr em atmosfera microaerófila.
5. Incube o caldo Preston a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 hr em atmosfera microaerófila.
6. Usando um loop estéril, estriar 10 μl de caldo de enriquecimento em RAPID'*Campylobacter* Agar.
7. Incube a tampa da placa a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24–48 h em atmosfera microaerófila.
8. *Campylobacter* formam colônias vermelhas no RAPID'*Campylobacter* Ágar.
9. Após o passo de incubação, as placas podem ser armazenadas a 2–8°C por 72 h.

Contagem de *Campylobacter* spp.

1. Dilua n g ou n ml da amostra em $9 \times n$ ml de caldo (de acordo com ISO 10272-2 e ISO 6887). Se necessário, realizar diluição 1:10.
2. Espalhe 0,1 ml da amostra e/ou suas diluições decimais em uma placa de Petri. Se necessário, para estimar números baixos, espalhe 1 ml da amostra em 3 placas de 90 mm (~0.33 ml/placa).
3. Placa incubadora por 44 ± 4 h a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ em atmosfera microaerófila.
4. *Campylobacter* formam colônias vermelhas no RAPID'*Campylobacter* Ágar.
5. Após o passo de incubação, as placas podem ser armazenadas a $2-8^\circ\text{C}$ por 72 h.
6. Consulte o padrão EN ISO 7218 para inoculação, contagem de colônias, cálculo e expressão dos resultados.


Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

1. No contexto do método padrão, execute testes de confirmação conforme descrito nas normas ISO 10272-1 ou ISO 10272-2.
2. No contexto do NF VALIDATION, todas as amostras identificadas como positivas devem ser confirmadas de uma das seguintes formas:
 - a. Usando os testes convencionais descritos nos métodos padrão ISO (incluindo a etapa de purificação).
 - b. Usando sondas nucléicas, conforme descrito na norma ISO 7218 (por exemplo, kit iQ-Check *Campylobacter* PCR em tempo real) usar colônias isoladas (com ou sem etapas de purificação).
 - c. Realizando um teste de aglutinação do látex utilizando o *Campylobacter* Confirm Latex.
 - d. Usando o teste MALDI Biotyper (o sistema Bruker Biotyper inclui um espectrômetro de massa MALDI TOF e o software MBT Compass, versão 4) diretamente de uma colônia isolada ou após uma etapa de purificação. As informações de identificação de gênero e/ou espécie fornecidas pela Solução Completa MALDI Biotyper não estão incluídas no escopo da marcação NF VALIDATION.
3. No caso de resultados discordantes (presumivelmente positivos com RAPID'*Campylobacter*, negativos com método de confirmação e particularmente com o teste do látex), o laboratório deve seguir as etapas necessárias para garantir a validade do resultado obtido.

Seção 9 Confirmação de outros métodos

Não se aplica.

Seção 10 Desempenho e validação do teste

Certificação	Escopo	Protocolo de Validação	Protocolo de Referência	Referência de Certificado
NF VALIDATION	Produtos à base de carne, aves e produtos avícolas, e amostras ambientais	EN ISO 16140-2	ISO 10272-2:2017	 BRD: 07/25-01/14 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO Certificado pela certificação AFNOR http://nf-validation.afnor.org/en

Seção 11 Referências

ISO 7218:2007/AMD1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1 : general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 10272-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method.

ISO 10272-2:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration *Campylobacter* spp. — Part 2: Colony-count technique.

United States Department of Agriculture (2016). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 41.04: Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0273bc3d-2363-45b3-befb-1190c25f3c8b/MLG-41.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 9, 2020.

Seção 12 Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Novembro de 2020	10000132429 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Alteração importante - Novo design de documento - Alteração do número do documento (versão anterior RAPID_Campylobacter_V04_20 Agosto de 2019)
Novembro de 2021	10000132429 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Esclarecimento do protocolo de secagem de placa - Esclarecimento do protocolo de inoculação para enumeração - Atualização de referências

Visite www.bio-rad.com/rapidmedia para obter mais informações sobre a nossa completa linha de meios cromogênicos RAPID

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK é uma marca comercial da Bio-Rad Europe GmbH em certas jurisdições.

Todas as marcas comerciais usadas neste documento são de propriedade de seus respectivos proprietários.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23
Mexico 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280
Norway 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188
South Africa 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23
Switzerland 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0122



10000132429 Ver B US/EG

RAPID' *Campylobacter* Agar

Manual del usuario

Medio cromogénico para la detección y recuento de las principales especies de *Campylobacter* termofílico (*C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*) en productos alimentarios y en muestras ambientales.

Referencia #12012036, placas preparadas, placas de 90 mm x 20

Referencia #3564295, deshidratado, 500 g

Referencia #3564296, Suplemento liofilizado, 10 viales



BIO-RAD

Tabla de Contenidos

Apartado 1	Introducción	1
Apartado 2	Principio de RAPID' <i>Campylobacter</i>	1
Apartado 3	Fórmula teórica	1
Apartado 4	Vida útil y conservación.....	1
Apartado 5	Materiales necesarios, pero no suministrados.....	2
	Equipamiento	2
	Fungibles	2
Apartado 6	Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad.....	2
Apartado 7	Protocolo	3
	Preparación del medio deshidratado	3
	Detección de <i>Campylobacter</i> spp.	4
	Recuento de <i>Campylobacter</i> spp.....	4
Apartado 8	Confirmación de los resultados positivos.....	4
Apartado 9	Confirmación de otros métodos	5
Apartado 10	Aplicaciones del ensayo y validaciones	5
Apartado 11	Referencias	6
Apartado 12	Historial de revisiones	6

Apartado 1 Introducción

Campylobacter se ha convertido en la causa más frecuente de gastroenteritis en humanos. *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* son las especies más comúnmente relacionadas con la infección. Las bacterias viven en el tracto intestinal del ganado vacuno, las ovejas, los cerdos y las aves y, por tanto, los alimentos de origen animal pueden contaminarse. La mayoría de las infecciones por *Campylobacter* se contraen por el consumo de agua contaminada, leche cruda y mal pasteurizada, y carnes poco cocinadas, en particular aves de corral. Se cree que la tasa de infección por *Campylobacter* es de tan solo 500 bacterias. La vigilancia indica que cada año millones de personas se infectan por *Campylobacter*. Los análisis para detectar la presencia de *Campylobacter* en los alimentos y en el entorno de procesamiento representan una práctica importante. El uso de sustratos cromogénicos en los medios de cultivo facilita el uso de los mismos con resultados basados en el cambio de color causado por reacciones enzimáticas.

Apartado 2 Principio de RAPID'*Campylobacter*

El uso de una mezcla nutritiva seleccionada asociada a un agente reductor permite el crecimiento de *Campylobacter* spp. termotolerante en un tiempo óptimo. Otras especies bacterianas, así como levaduras y mohos, son inhibidas por los agentes selectivos. *Campylobacter* forma colonias de color rojo ladrillo en RAPID'*Campylobacter*.

Apartado 3 Fórmula teórica

Mezcla nutritiva	28,5 g
Agentes selectivos	0,082 g
Mezcla cromogénica	0,05 g
Mezcla de reducción	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Tampón	1,25 g
Agar	14 g
Agua destilada	c.s.p. 1.000 ml

pH final a 25° C = 7,2–7,5

Apartado 4 Vida útil y conservación

- Deshidratado: 15–25° C en un envase cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro
- Suplemento: 2–8° C en un lugar oscuro
- Preparado: 2–8° C en un lugar oscuro
- Placa preparada a partir de medio base deshidratado: 2 semanas a 2–8° C en un envase cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro
- Medio no suplementado: 6 semanas a 2–8° C en un lugar oscuro

Apartado 5

Materiales necesarios, pero no suministrados

Equipamiento

- Todo el instrumental habitual en laboratorio
- Placa calefactada
- Balanza, sensibilidad de 0,1 g
- Agitador/homogeneizador
- Incubador o sala de incubación controlada termostáticamente, con una precisión de $\pm 1^\circ \text{C}$
- Baño termostático

Fungibles

- Confirmación: *Campylobacter* Confirm Latex (referencia #3564297); Columbia Agar (referencia #3563784); iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR Kit (referencia #3578135); Oxidase Test (referencia #35934260); Physiological Sterile Water (referencia #3554164); Sterile Water (referencia #3554154)
- Medio de enriquecimiento para la detección: Caldo Bolton o Preston
- Diluyente para recuento: Agua de Peptona Tamponada, APT Plus (referencia #3554179, 225 ml x 6 frascos; 3564684, 500 g; 3555790, 2 x 5 L bolsas; 3555795, 4 x 3 L bolsas); APT Standard (referencia #12013258, 5 kg; 12013259, 500 g; 12013260, 2 x 5 L bags); Tryptone Salt (referencia #3555754, 9 ml x 25 tubos; 3555756, 225 ml x 6 frascos; 3564544, 500 g; 3555796, 3 L x 4 bolsas)
- Asas de siembra
- Placas de Petri estériles (90 mm)
- Pipetas estériles
- Bolsas estériles para pesada

Apartado 6

Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad

Precauciones

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 7218). Se debe usar una protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas como *Campylobacter*.
- Los medios que han estado en contacto con muestras de alimentos deben considerarse potencialmente contaminados y deben eliminarse de conformidad con las normas y reglamentos locales.
- No exponer las placas de Petri a la luz.

Apartado 7 Protocolo

- Después de la preparación, deje que las placas de Petri se estabilicen por lo menos 1 noche a temperatura ambiente.
- Las placas deben ser pre-secadas para asegurar que están libres de humedad (EN ISO 7218). Por ejemplo, las placas pueden secarse dejándolas con la superficie del agar hacia arriba en una cabina de seguridad con flujo laminar (a temperatura ambiente) durante 20–30 min
- La confirmación de menos de 5 colonias implica el riesgo de realizar una sobreestimación debido a la presencia de colonias típicas que podrían no corresponder a *Campylobacter* spp.

Limitaciones de uso

- Durante el estudio de la NF VALIDATION, *Ralstonia mannitolytica* produjo colonias típicas en RAPID'*Campylobacter* después de 48 hr de incubación. Esta cepa, que rara vez se encuentra en las matrices de alimentos, proporciona una confirmación negativa. Produce una reacción de aglutinación atípica con *Campylobacter* Confirm Latex, débil y de apariencia atípica (mucoide/cremosa) en lugar de la aglutinación de partículas normal, granulosa, homogénea y densa.
- Durante el estudio de validación NF VALIDATION, *C. upsaliensis* no pudo crecer en RAPID'*Campylobacter* agar
- Si el recuento de las colonias no es evidente después de 24 hr de incubación, reincube la placa durante un total de 48 hr.
- En caso de producirse resultados discordantes (supuestos positivos con RAPID'*Campylobacter*, negativos con el método de confirmación), el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para garantizar la validez del resultado obtenido.

Control de calidad

- Todos los productos fabricados y comercializados por Bio-Rad están sujetos a un protocolo de garantía de calidad en todas las etapas, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización de los productos acabados. Cada lote de producto acabado se somete a un control de calidad según la norma EN ISO 11133 y su comercialización está condicionada a que cumpla los criterios de aceptabilidad. La documentación relativa a la producción y el control de calidad de cada lote se mantiene archivada.
- Para más información sobre la seguridad de los productos en las fichas de datos de seguridad y el certificado de análisis, visite www.bio-rad.com.

Apartado 7 Protocolo

Preparación del medio deshidratado

1. Agitar siempre el frasco antes de usar.
2. Disolver 20 g de polvo en 370 ml de agua destilada y mezclar hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Calentar suavemente, agitando frecuentemente, y luego llevar a ebullición.
4. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Apartado 8 Confirmación de los resultados positivos

5. Enfriar el medio a 47–50° C.
6. Rehidratar asépticamente el suplemento liofilizado con 30 ml de agua destilada estéril. Agitar hasta su completa disolución.
7. Asépticamente, añadir 1 vial de suplemento reconstituido. Mezclar bien y verter en las placas de Petri.
8. Un frasco de 500 g de medio deshidratado permite obtener 10 L de medio.

Detección de *Campylobacter* spp.

1. Para el método normalizado, siga el protocolo de enriquecimiento descrito en la norma ISO 10272-1:2017.
2. Para el método alternativo, diluya n g o n ml de muestra en $9 \times n$ ml de caldo Bolton o Preston. Por ejemplo, diluya 25 g o 25 ml de muestra en 225 ml de caldo Bolton o Preston para obtener una dilución 1/10.
3. Homogeneice con agitador/homogeneizador.
4. Incube el caldo Bolton a $37 \pm 1^\circ$ C durante 4-6 hr y luego a $41,5 \pm 1^\circ$ C durante 44 ± 4 hr en atmósfera microaerofílica.
5. Incube el caldo Preston a $41,5 \pm 1^\circ$ C durante 24 ± 2 hr en una atmósfera microaerofílica.
6. Usando un asa estéril, siembre 10 μ l de caldo de enriquecimiento en RAPID' *Campylobacter* Agar.
7. Incube la placa invertida a $41,5 \pm 1^\circ$ C durante 24–48 hr en una atmósfera microaerofílica.
8. *Campylobacter* forma colonias de color rojo ladrillo en el medio RAPID' *Campylobacter* Agar.
9. Tras la etapa de incubación, las placas pueden almacenarse a 2-8° C durante 72 hr.

Recuento de *Campylobacter* spp.

1. Diluya n g o n ml de muestra en $9 \times n$ ml de caldo (conforme a la norma ISO 10272-2 y ISO 6887). Si fuese necesario, realizar una dilución 1:10.
2. Extender 0,1 ml de muestra y/o sus diluciones decimales en una placa Petri. Si fuese necesario estimar números bajos, distribuya 1 ml de muestra sobre tres placas de 90 mm (~0.33 ml/placa).
3. Incube la placa durante 44 ± 4 hr a $41,5 \pm 1^\circ$ C en una atmósfera microaerofílica.
4. *Campylobacter* forma colonias de color rojo ladrillo en el medio RAPID' *Campylobacter* Agar.
5. Tras la etapa de incubación, las placas pueden almacenarse a 2-8° C durante 72 hr.
6. Consulte en la norma EN ISO 7218 la inoculación, el recuento de colonias, el cálculo y la expresión de los resultados.

Apartado 8

Confirmación de los resultados positivos

1. En el contexto del método normalizado, realice las pruebas de confirmación como se describe en las normas ISO 10272-1 o ISO 10272-2.


Apartado 9 Confirmación de otros métodos

2. Con respecto a la validación NF VALIDATION, todas las muestras identificadas como positivas deben confirmarse de una de las siguientes formas:
 - a. Empleando las pruebas convencionales descritas en los métodos normalizados ISO (incluida la fase de purificación).
 - b. Utilizando sondas nucleicas como se describe en la norma ISO 7218 (por ejemplo, iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR Kit) sobre colonias aisladas (con o sin fase de purificación).
 - c. Realizando una prueba de aglutinación con el *Campylobacter* Confirm Latex.
 - d. Usando MALDI Biotyper test (sistema de biotipado de Bruker que incluye un espectrofotómetro de masas MALDI time-of-flight y MBT Compass Software, version 4) directamente sobre una colonia aislada o tras la fase de purificación. La información sobre identificación de género y/o especie proporcionada por la solución completa MALDI Biotyper no está incluida en el alcance de NF VALIDATION.
3. En caso de producirse resultados discordantes (supuestos positivos con RAPID'*Campylobacter*, negativos con el método de confirmación, y en particular con la prueba de látex), el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para garantizar la validez de los resultados obtenidos.

Apartado 9 Confirmación de otros métodos

No aplicable.

Apartado 10 Aplicaciones del ensayo y validaciones

Certificación	Alcance	Protocolo de validación	Protocolo de referencia	Referencia de certificado
NF VALIDATION	Productos cárnicos, aves de corral y productos avícolas y muestras ambientales	EN ISO 16140-2	ISO 10272-2:2017	 BRD: 07/25-01/14 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA AGROINDUSTRIA Certificado mediante certificación AFNOR http://nf-validation.afnor.org/en

Apartado 11

Referencias

ISO 7218:2007/AMD1:2013 – Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico

ISO 6887-1:2017 – Microbiología de la cadena alimentaria – Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico – Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales

ISO 10272-1:2017. Microbiología de la cadena alimentaria – Método horizontal para la detección y el recuento de *Campylobacter* spp. — Parte 1: Método de detección.

ISO 10272-2:2017. Microbiología de la cadena alimentaria – Método horizontal para la detección y el recuento de *Campylobacter* spp. — Parte 2: Técnica del recuento de colonias.

United States Department of Agriculture (2016). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 41.04: Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0273bc3d-2363-45b3-befb-1190c25f3c8b/MLG-41.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 9, 2020.

Apartado 12

Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
Noviembre 2020	10000132429 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Cambio significativo - Nuevo diseño del documento - Cambio en el número del documento (versión anterior RAPID_Campylobacter_V04_20 agosto de 2019)
Noviembre 2021	10000132429 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Aclaración del protocolo de secado de placas - Aclaración del protocolo de inoculación para enumeración - Actualización de referencias (literatura)

Visite www.bio-rad.com/rapidmedia para más información sobre nuestra gama completa de medios cromogénicos RAPID.

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK es una marca registrada de Bio-Rad Europe GMBH en diversos países.

Todas las marcas comerciales utilizadas en el presente documento son propiedad de sus respectivos dueños.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

*Life Science
Group*

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23
Mexico 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280
Norway 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188
South Africa 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23
Switzerland 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0122



RAPID' *Campylobacter* Agar

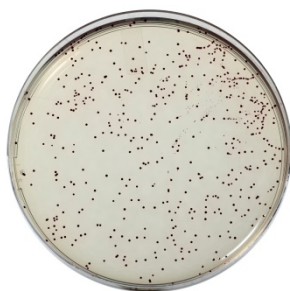
用户指南

用于检测和计数食品和环境样品中主要嗜热 *弯曲杆菌*（*空肠弯曲杆菌*、*大肠弯曲杆菌*和 *拉里弯曲杆菌*）的显色培养基

目录 #12012036, 即用型平板, 90 mm x 20 个培养皿

目录 #3564295, 干粉, 500 g

目录 #3564296, 添加剂, 冻干, 10 小瓶



BIO-RAD

目录

第 1 部分 简介	1
第 2 部分 RAPID [®] <i>Campylobacter</i> 原理	1
第 3 部分 理论配方	1
第 4 部分 保质期及储存条件	2
第 5 部分 其他仪器、试剂与耗材	2
仪器	2
试剂和耗材	3
第 6 部分 预防措施、使用限制和质量控制	3
第 7 部分 操作流程	4
干粉培养基的制备	4
<i>弯曲杆菌属</i> 检测	5
<i>弯曲杆菌属</i> 计数	6
第 8 部分 阳性结果的确认	6
第 9 部分 其他方法的确认	7
第 10 部分 测试性能和验证	7
第 11 部分 参考资料	7
第 12 部分 修订记录	8

第 1 部分

简介

第 1 部分

简介

*弯曲杆菌*已成为人类胃肠炎的最常见原因。*空肠弯曲杆菌*、*大肠弯曲杆菌*和*拉里弯曲杆菌*是最常被确认为引起人类感染的菌属。这种细菌存在于牛、羊、猪和鸟类的肠道中，因此动物源性食物可能会受到污染。大多数*弯曲杆菌*是通过饮用受污染的水源、未经充分消毒的生牛奶和未煮熟的肉类，尤其食用家禽而感染。*弯曲杆菌*的感染剂量被认为低至 500 个细菌。监测表明，每年有数百万人感染*弯曲杆菌*。检测食品和加工环境中是否存在*弯曲杆菌*是一项重要的规定。在培养基中使用显色底物提高了培养基的易用性，根据酶促反应引起的显著颜色变化从而得出最终结果。

第 2 部分

RAPID' *Campylobacter* 原理

使用与还原剂相关的选定营养混合物可以使耐高温的*弯曲杆菌*在最佳时间内生长。其他细菌种类以及酵母和霉菌，都被选择性药剂所抑制。*弯曲杆菌*在 RAPID' *Campylobacter* 培养基上产生砖红色的菌落。

第 3 部分

理论配方

营养混合物	28.5 g
选择性制剂	0.082 g
显色混合物	0.05 g
还原混合物	1 g
氯化钠	5 g
缓冲液	1.25 g
琼脂	14 g
蒸馏水	qsp 1,000 ml

25°C 时的最终 pH 值 = 7.2–7.5

第 4 部分

保质期及储存条件

第 4 部分

保质期及储存条件

- 干粉：在 15–25° C 下妥善密封包装，置于干燥避光处
- 添加剂：2–8° C 避光处
- 预先浇注：2–8° C 避光处
- 由干粉基料制备的平板：在 2–8° C 下妥善密封包装，干燥避光处储存 2 周
- 非补充培养基：2–8° C 下避光处储存 6 周

第 5 部分

其他仪器、试剂与耗材

仪器

- 所有常用的实验室仪器
- 热平板
- 天平，灵敏度为 0.1 g
- 搅拌器/均质器
- 恒温控制的孵化器或孵化室，精确到 $\pm 1^{\circ}$ C
- 水浴

第 6 部分

预防措施、使用限制和质量控制

试剂和耗材

- 确认：Campylobacter Confirm Latex（目录 #3564297）；Columbia 培养基（目录 #3563784）；iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR Kit（目录 #3578135）；氧化酶试验（目录 #35934260）；生理性无菌水（目录 #3554164）；无菌水（目录 #3554154）
- 检测用增菌培养基：博尔顿或普雷斯顿肉汤
- 计数稀释剂：缓冲蛋白胨水，BPW Plus（目录 #3554179, 225 ml x 6 瓶；3564684, 500 g；3555790, 2 x 5 L 袋；3555795, 4 x 3 L 袋）；BPW 标准（目录 #12013258, 5 kg；12013259, 500 g；12013260, 2 x 5 L 袋）；胰蛋白胨盐（目录 #3555754, 9 ml x 25 管；3555756, 225 ml x 6 瓶；3564544, 500 g；3555796, 3 L x 4 袋）
- 接种环
- 无菌培养皿 (90 mm)
- 无菌移液管
- 无菌称重袋

第 6 部分

预防措施、使用限制和质量控制

预防措施

- 遵守良好实验室规范 (EN ISO 7218)。在处理 *弯曲杆菌* 等具有潜在传染性的活细菌时，应穿戴适当的防护装置，如手套和实验室外套
- 与食品样品接触过的培养基应被视为潜在传染性材料处理，并根据当地法规和规定进行废弃物处理
- 请勿将培养皿暴露在光线下
- 准备完毕后，让培养皿在室温下稳定至少 1 个晚上。

第 7 部分

操作流程

- 按照EN ISO7218方法,平板在使用前必须预先干燥以确保没有过多的水分. 比如可将平板放置在层流柜里面朝上干燥20-30分钟
- 确认少于 5 个菌落时, 由于存在可能不是 *弯曲杆菌*的典型菌落, 因此有可能出现高估的情况。

使用限制

- 在 NF 验证研究中, *解甘露醇罗尔斯顿菌*在培养 48 小时后在 RAPID' *Campylobacter* 平板上产生了典型的菌落。这种菌株很少在食品基质中发现, 确认为阴性。它与 *弯曲杆菌*确认乳胶发生非典型凝集反应, 外观微弱且非典型 (粘液状/凝固状), 而不是正常的颗粒状凝集, 颗粒状、均匀且致密
- 在 NF 验证研究期间, 上列 *弯曲杆菌*无法在 RAPID' *Campylobacter* 培养基上生长
- 如果培养 24 小时后菌落不容易计数, 则将平板重新培养总共 48 小时
- 如果出现不一致的结果 (RAPID' *Campylobacter* 为阳性, 确认性方法为阴性), 实验室必须进采取足够的措施以确保结果的有效性

质量控制

- Bio-Rad 公司生产和销售的每一种产品, 从接收原材料到销售成品的各个阶段都要受到质量保证程序的约束。每批成品都根据 EN ISO 11133 进行质量控制, 只有满足验收标准才能上市。与每批次的生产和质量控制有关的文件均进行存档。
- 有关 SDS 产品安全信息和分析证书, 请访问 www.bio-rad.com。

第 7 部分

操作流程

干粉培养基的制备

1. 使用前请摇晃瓶子。
2. 将 20 g 粉末溶解在 370 ml 蒸馏水中, 并进行搅拌, 直到得到均匀的悬浮液。
3. 缓慢加热, 不断搅拌, 然后煮沸。

第 7 部分

操作流程

4. 121° C 高压灭菌 15 分钟。
5. 冷却培养基至 47-50° C。
6. 用 30 ml 无菌蒸馏水在无菌条件下再水化冻干添加剂。搅拌直到完全溶解。
7. 在无菌条件下加入 1 小瓶复苏的添加剂。搅拌均匀，倒入培养皿中。
8. 一瓶 500 g 粉末可制成 10 L 培养基。

弯曲杆菌属检测

1. 对于标准方法，遵循 ISO 10272-1:2017 中描述的增菌方案。
2. 对于替代方法，将 n g 或 n ml 样品在 $9 \times n$ ml 博尔顿肉汤或普雷斯顿肉汤中进行稀释。例如，将 25 g 或 25 ml 样品在 225 ml 博尔顿肉汤或普雷斯顿肉汤中进行稀释，以获得 1/10 的稀释度。
3. 用搅拌器/均质器进行均质处理。
4. 将博尔顿肉汤在 $37 \pm 1^\circ \text{C}$ 下培养 4-6 小时，然后在微需氧环境中在 $41.5 \pm 1^\circ \text{C}$ 下培养 44 ± 4 小时。
5. 将雷斯顿肉汤在微需氧环境中在 $41.5 \pm 1^\circ \text{C}$ 下培养 24 ± 2 小时。
6. 使用无菌环，在 RAPID' *Campylobacter* 培养基上滴加 10 μl 增菌液。
7. 在 $41.5 \pm 1^\circ \text{C}$ 下，将平板盖子放下，在微需氧环境中培养 24-48 小时。
8. 弯曲杆菌在 RAPID' *Campylobacter* 培养基上形成砖红色的菌落。
9. 培养结束后，平板可以在 $2-8^\circ \text{C}$ 下储存 72 小时。

第 8 部分

阳性结果的确认

弯曲杆菌属计数

1. 将 n g 或 n ml 样品在 $9 \times n$ ml 肉汤中稀释（根据 ISO 10272-2 和 ISO 6887）。如有需要, 可进行 1:10 稀释.
2. 将 0.1 毫升样品及十倍稀释液涂布在培养皿上, 如需要可计算样本所需的体积, 将 1 毫升样品涂布在三个 90毫米的培养皿上 (即每个平板0.33毫升)。
3. 在 $41.5 \pm 1^\circ \text{C}$ 的微需氧环境下, 将平板培养 44 ± 4 小时。
4. 弯曲杆菌在 RAPID' *Campylobacter* 培养基上形成砖红色的菌落。
5. 培养结束后, 平板可以在 $2-8^\circ \text{C}$ 下储存 72 小时。
6. 关于接种、菌落计数、计算和结果表达, 请参考 EN ISO 7218 标准。

第 8 部分

阳性结果的确认

1. 在标准方法的背景下, 按照 ISO 10272-1 或 ISO 10272-2 标准中的描述, 进行确认测试。
2. 在 NF 验证的背景下, 所有被确定为阳性的样品必须以下列方式之一加以确认：
 - a. 使用 ISO 标准方法中描述的常规测试（包括纯化步骤）。
 - b. 使用 ISO 7218 标准中描述的核探针（例如, iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR Kit）、使用分离的菌落（有或无纯化步骤）。
 - c. 使用弯曲杆菌确认乳胶进行乳胶凝集试验。
 - d. 直接从分离的菌落或在纯化步骤之后采用 MALDI Biotyper 试验（Bruker Biotyper 系统包括 MALDI 飞行时间质谱仪和 MBT Compass 软件, 第 4 版）。由 MALDI Biotyper Complete Solution 提供的菌属和/或菌种的鉴定信息不包括在 NF 验证标志的范围内。
3. 如果出现不一致的结果（RAPID' *Campylobacter* 推定为阳性, 而确认法特别是乳胶试验则为阴性）,

第 9 部分

其他方法的确认

实验室必须遵循必要的步骤，以确保所获结果的有效性。

第 9 部分

其他方法的确认

不适用。

第 10 部分

测试性能和验证

证书	范围	验证方案	参考方案	证书参考
NF 验证	肉类产品、家禽和家禽产品以及环境样品	EN ISO 16140-2	ISO 10272-2:2017	 BRD : 07/25-01/14 农业企业的替代分析方法 通过 AFNOR 认证 http://nf-validation.afnor.org/en

第 11 部分

参考资料

ISO 7218:2007/AMD1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1 : general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 10272-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method.

第 12 部分

修订记录

ISO 10272-2:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration *Campylobacter* spp. — Part 2: Colony-count technique.

United States Department of Agriculture (2016). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 41.04: Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0273bc3d-2363-45b3-befb-1190c25f3c8b/MLG-41.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 9, 2020.

第 12 部分

修订记录

发布日期	文件编号	变更
2020 年 11 月	10000132429 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- 主要变更- 新的文档设计- 文件编号变更（先前版本 RAPID_Campylobacter_V04_20,2019 年 8 月）
2021 年 11 月	10000132429 Ver B	<ul style="list-style-type: none">- 平板干燥方法的阐明- 接种计数方法的阐明- 参考资料的更新

请访问 www.bio-rad.com/rapidmedia, 了解有关我们全系列 RAPID 显色培养基的更多信息

BIO-RAD 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的商标。

IQ-CHECK 是 Bio-Rad Europe GMBH 在某些司法管辖区的商标。

此处使用的所有商标均为其各自所有者的财产。



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

*Life Science
Group*

Website *bio-rad.com* **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23
Belgium 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500
Czech Republic 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23
Japan 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23
Mexico 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280
Norway 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188
South Africa 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23
Switzerland 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0122



10000132429 Ver B US/EG