

ASL N. 4 L'Aquila Ospedale San Salvatore	Procedura Operativa Standard	Rev 1.0
Dip. Patologia Clinica U.O. Medicina di Laboratorio	Esame culturale feci per ricerca di <i>Campylobacter</i>	Ott. 2002
Settore Batteriologia tel 0862 368688		

1-Principio del test

Inoculazione del campione di feci in mezzi di coltura definiti per l'isolamento dei patogeni del tratto gastrointestinale del genere *Campylobacter*.

2-Applicazione clinica

Le diarree infettive sono grandi problemi di salute pubblica in qualsiasi parte del mondo, principalmente nei paesi in via di sviluppo. Le diarree infettive continuano ad essere la maggiore causa di mortalità nel mondo attuale. *C. jejuni* è secondo alcuni studi il più comune patogeno enterico isolato in corso di diarrea. Le infezioni da *Campylobacter* sono di solito sporadiche, frequenti in estate e autunno, seguono alla ingestione di cibo poco cotto, principalmente da pollame. La maggiore incidenza avviene in bambini e giovani adolescenti, un secondo picco riguarda giovani adulti. Epidemie occorrono in primavera ed autunno e sono state associate ad ingestione di latte e acqua. *C. jejuni* è riconosciuto come causa antecedente della sindrome di Guillain-Barré (GBS), una malattia acuta che porta a paralisi del sistema nervoso periferico. La patogenesi della GBS indotta da infezione da *Campylobacter* non è ancora ben compresa ma in parte coinvolge epitopi ganglioside-like del lipopolisaccaride di *Campylobacter* che cross reagisce con target reattivi del tessuto nervoso periferico. *Campylobacter* per primo colonizza lo strato di muco intestinale grazie alla sua caratteristica motilità e quindi invade e/o transloca attraverso l'epitelio verso il tessuto sottostante.

3- Campione

RACCOLTA: campioni di feci devono essere coltivati per diagnosticare le gastroenteriti batteriche. Le infezioni batteriche sono rare dato il pH dello stomaco estremamente acido; pertanto la maggior parte delle infezioni coinvolgono l'intestino. I sintomi clinici della gastroenterite includono nausea, vomito e diarrea con febbre. Nausea e vomito risultano usualmente dalla ingestione di tossine pre-formate. La storia clinica del paziente è particolarmente significativa per la determinazione del tipo di infezione. La qualità dell'acqua e degli alimenti ingeriti, viaggi in aree con scarse condizioni igienico sanitarie, l'uso recente di antibiotici e conoscenza di problemi simili in membri della famiglia sono punti importanti da considerare. I campioni di feci sono campioni più adeguati dei tamponi rettali. Un esame diretto delle feci alla ricerca dei PMN fecali, parassiti e lieviti deve essere realizzato prima della coltura. La presenza di molti leucociti è frequentemente un marker di infezione batterica.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Per i pazienti ospedalizzati, la regola dei “3 giorni” (rigetto dei campioni raccolti dopo 72 ore dall’ammissione) deve essere scelto come criterio per l’accettazione delle colture di routine. Per la routine è sufficiente un solo campione. Si può ricorrere a un terreno di trasporto del campione di feci se l’arrivo al laboratorio è posticipato di > 2 ore e per il trasporto dei tamponi rettali .I tamponi rettali sono accettabili per le colture. Il migliore terreno di trasporto per *Campylobacter* è il Cary-Blair medium con ridotta concentrazione di Agar .I campioni trasportati in Cary-Blair medium possono essere conservati a 4°C se non processati immediatamente.

I campioni vanno raccolti durante le prime fasi della infezione prima di iniziare il trattamento con antibiotici (quando sia il caso).Infatti la presenza dei patogeni nelle feci in numero elevato, è più probabile in questa circostanza . I campioni vanno raccolti in recipienti sterili di misura adeguata , con coperchio a chiusura ermetica. All’arrivo al laboratorio le feci devono essere processate nel minore tempo possibile, non oltre le 2 ore dopo la raccolta. Nel caso non sia possibile , una quantità deve essere raccolta con un tampone, inserendolo con movimento rotatorio nelle feci, oppure si può pensare di raccogliere un tampone rettale in un mezzo di trasporto appropriato. Arrivato al laboratorio , il campione va osservato per la consistenza (feci formate, liquide, ecc.), colore, componenti atipiche (sangue, muco, ecc.).

4- Standard, Controlli, Reagenti

Per la ricerca nelle feci di *Campylobacter spp* si usano i seguenti mezzi:

AGAR PRIVI DI SANGUE	AGAR CONTENENTI SANGUE
-Karmali	-Butzler
-Preston modificato CCDA	-Blaser-Wang
-CAT	-Skirrow

Per la loro composizione e formula si fa riferimento alla 3a edizione del manuale Biolife.

SELECTIVE CAMPYLOBACTER AGAR

L’Agar selettivo per *Campylobacter* da noi usato , contiene una miscela di antibiotici ed è addizionato di 10% di sangue di montone. Questo mezzo a base di sangue possiede varie formulazioni modificate, disponibili in commercio. Il mezzo consiste di una base ricca e nutritiva (tipo Agar Brucella) supplementato con anfotericina B, cefalotina, polimixina B, trimetoprim, vancomicina e sangue di montone defibrinato al 10%. Gli antimicrobici sopprimono lo sviluppo della flora fecale normale, facilitando l’isolamento batterico. Se dobbiamo usare un mezzo di arricchimento in brodo del campione, useremo normalmente il brodo Tioglicolato addizionato dei sopradetti supplementi. Dato che si è scoperto che *Campylobacter fetus subspecies fetus* dimostra sensibilità alla cefalotina, il mezzo per l’isolamento di *Campylobacter* sviluppato da SKIRROW (che non contiene questo antibiotico) è molto utilizzato. L’incubazione delle piastre

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

inoculate deve essere fatta a 37-42°C in una atmosfera approssimativamente di 5-10% di ossigeno e 5-12% di CO₂. Noi usiamo le buste Genbag® in microaerofilia della Biomerieux. Molti mezzi selettivi come mezzo di Skirrow, hanno una buona selettività per temperatura di incubazione di 42°C, mentre i mezzi al carbone hanno buone proprietà selettive a 37°C.

METODO DELLA MEMBRANA FILTRANTE PER L'ISOLAMENTO DI *CAMPYLOBACTER* spp.

Un metodo molto elegante che permette un superiore recupero di batteri del genere *Campylobacter* (quando presenti in carica elevata) è l'uso della membrana filtrante della Whatman che ha una porosità di 0.45 µm. Si pone una membrana su una piastra di comune Agar Columbia 5% di montone. Essa si imbeve rapidamente di umidità. Si fa una sospensione fecale in 3 ml di acqua peptonata o brodo brucella o brodo tioglicolato (rapporto 1:4). Si depositano da 10 a 15 gocce di questa sospensione sopra la membrana. Si pone in termostato a 37-42°C e si lascia che il movimento a cavaturacciolo dei batteri del tipo *Campylobacter* penetrino i pori. Si toglie la membrana dopo una ora. Si nota un certo annerimento della superficie sottostante dovuto all'acidità delle feci. Si fa un movimento a zig zag sopra l'anello. Si mette la piastra dentro una busta di plastica con dentro una bustina di microaerofilia (sistema Genbag® della Biomerieux). Si incuba per 48 ore a 37-42°C. Campioni di feci che contengono una elevata carica di *Campylobacter* sono rilevati con questo metodo: pertanto la filtrazione non è sensibile come la coltura primaria su mezzi selettivi. Il metodo della membrana filtrante è usato per scopi di ricerca e per complementare la coltura su mezzi selettivi dove i supplementi antibiotici potrebbero inibire determinati ceppi sensibili.

Colonie giallo-grigie, piatte, che seguono la linea di strisciamento dell'ansa di dimensioni 1-2 mm	<i>Campylobacter</i> spp.
---	---------------------------

5- Strumenti

Le identificazioni dei *Campylobacter* isolati, vanno fatte presuntivamente su batteri Gram negativi a forma di ali di gabbiano (a S), ossidasi positivi, catalasi positivi. Si raccomanda l'uso del *Campylobacter* test kit della Oxoid. Si tratta di un test al lattice per la identificazione delle specie enteropatogene di *Campylobacter* da terreni di coltura solidi (copre *C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. lari* e *C. coli*). Il test dell'idrolisi dell'ippurato è il maggior test per distinguere *Campylobacter jejuni* dalle altre specie di *Campylobacter*. Esistono metodi commerciali su dischetti per questo test discriminante. Le colonie sospette sono piatte, grigio traslucide, che diffondono lungo le linee di striscio. In genere *Campylobacter jejuni* è sensibile all'acido nalidixico, così come *C. coli*, mentre *C. fetus subsp. Fetus* è resistente.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

6- Procedimento Dettagliato

ESAME BATTERIOSCOPICO: Nel caso il campione contenga muco, sangue, pus o altro materiale atipico, si deve fare un esame batterioscopico colorato con il metodo di Gram, indipendentemente dalla richiesta del clinico. Come contro-colorazione è preferibile la carbol fucsina o 0.1% di fucsina basica in quanto i batteri non sono ben evidenti con la contro-colorazione con safranina. I leucociti fecali possono essere presenti nelle infezioni diarroiche da *Campylobacter* in percentuale di 25-80%. La probabilità di isolare *Campylobacter* ed altri batteri enteroinvasivi è alta in presenza di leucociti fecali, ma l'assenza di leucociti fecali non esclude la malattia. Pertanto non usare lo screening per la ricerca dei leucociti fecali come criterio per decidere se c'è infezione batterica o per la ricerca selettiva di *Campylobacter*. Nella batterioscopia osservare la presenza/assenza dei batteri Gram negativi (in relazione alla flora anaerobica normale), ai cocci gram positivi, ai lieviti e ai polimorfo nucleati (rari, moderata presenza, accentuata presenza, ecc.). E' possibile fare anche un esame batterioscopico a fresco dopo diluizione con acqua peptonata o soluzione fisiologica per osservare la presenza di batteri che si agitano con movimento a cavatappi.

SEMINA DI ROUTINE: I campioni devono essere inoculati nel modo più rapido possibile in laboratorio. La inoculazione può essere fatta direttamente o dopo diluizione. L'inoculo dopo diluizione è utile nel metodo della membrana filtrante. La diluizione dell'inoculo ha lo scopo di liberare i batteri dalla massa fecale e ridurre la flora competente, permettendo la migliore separazione delle colonie e la loro più facile identificazione. Se l'inoculazione diretta o previa diluizione non è immediata, si deve passare un tampone nel campione, raccogliendo materiale sufficiente e inoculandolo in un mezzo di trasporto adeguato, mantenuto a temperatura ambiente fino al momento della semina in mezzi solidi. L'apparenza dei campioni è registrata come "formata" o "liquida". Per feci formate, una porzione del materiale fecale grande come un pisello (circa 1 gr) è emulsionato in 3 ml di 0.1% acqua peptonata (Maximum Recovery Diluent della Oxoid). Per campioni liquidi, fare una diluizione 1:4 in MRD.

Semina diretta: Un tampone sterile di cotone è infilato nel materiale fecale e una porzione è inoculata in un terzo della superficie totale di ogni piastra. L'inoculo viene strisciato, con una ansa sterile, per ottenere eventuali colonie isolate.

Inoculo diluito: Una pipetta del tipo Pastette è usata per deporre due gocce di sospensione fecale in Agar selettivo per *Campylobacter*, e strisciato per isolare le colonie singolarmente. Se si usa il metodo della membrana filtrante, si depositano 10-15 gocce sopra la membrana di nylon posta sopra l'Agar sangue 5% di montone. Si lascia assorbire per circa una ora in termostato. Si toglie la membrana e si striscia a zig zag.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Le piastre di Agar Campylobacter selettivo o le piastre di Agar sangue 5% di montone , vengono incubate in microaerofilia a 37-42 °C per 48 ore con le buste GenBag ® .

IDENTIFICAZIONE DI *CAMPYLOBACTER* spp.: Le colonie sospette devono essere identificate per conoscere con esattezza la specie che causa la infezione .Si fa un Gram delle colonie sospette per evidenziare i tipici spirilli Gram negativi .Le colonie devono essere ossidasi positive. Il Campylobacter Test kit della Oxoid sfrutta particelle di lattice blu , essiccate sul cartoncino di reazione e sensibilizzate con anticorpo di coniglio reattivo nei confronti di selezionati antigeni della superficie cellulare di *Campylobacter* .Quando un estratto antigenico di *Campylobacter* è mescolato con il reagente test si osserva agglutinazione causata dalla reazione crociata tra l'anticorpo coniugato con il lattice e gli antigeni di *Campylobacter* .

- 1) Estrarre un cartoncino di reazione dalla custodia protettiva e risigillare.
- 2) Aggiungere una goccia di reagente di estrazione 1 nella provetta di estrazione. Prelevare una sufficiente quantità di patina batterica e sospenderla nel reagente 1 per tre minuti .Non scartare l'ansa che rimane dentro la provettina.
- 3) Aggiungere all'estratto due gocce di reagente 2.Mescolare utilizzando la medesima ansa.
- 4) Utilizzando una pastette porre una goccia (circa 50 µL) di estratto neutralizzato nell'area test ed una goccia nell'area di controllo .Mescolare l'estratto nel lattice di controllo e successivamente nel lattice test .Spandere le miscele reattive all'interno dell'intera area dei rispettivi cerchi.
- 5) Inclinare delicatamente e ruotare con movimento circolare il cartoncino di reazione per 3 minuti. Osservare se interviene agglutinazione.
- 6) Eliminare il cartoncino di reazione in una soluzione disinfettante.

Tabella I :Caratteristiche biochimiche differenziali all'interno delle specie identificate dal kit Campylobacter Test kit Oxoid :

TEST	<i>C. jejuni jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C.lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Citocromo ossidasi	+	+	+	+
Catalasi	+	+ -	+	+
Crescita a 42°C	+	+	+	+ -
Cefalotina	Resistente	Resistente	Resistente	Sensibile
Acido Nalidixico	Variabile	Variabile	Resistente	Sensibile
Idrolisi dell'ippurato	+	-	-	-

ANTIBIOGRAMMA:

L'antibiogramma è eseguito con test di diffusione in Agar Mueller-Hinton al 5% di sangue di montone incubato per 48 h in condizioni microaerobiche. Si consiglia testare i seguenti antibiotici :acido nalidixico, ciprofloxacina, cefalotina, tetraciclina, monociclina,

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

norfloxacin, ofloxacin, eritromicina, rokitamicina, gentamicina, cloramfenicolo, amoxicillina-acido clavulanico. I test di suscettibilità per *Campylobacter* non sono ancora ben standardizzati. Il metodo di riferimento è il metodo dell'Agar diluizione. Si raccomanda anche l'uso dell'E test® che correla molto bene con i metodi di Agar diluizione.

7-Calcoli

Non applicato

8- Controllo di qualità interno

Settimanalmente sono inoculati campioni batterici con profili fenotipici conosciuti per verificare la efficacia dei mezzi di coltura utilizzati. In particolare nel nostro laboratorio usiamo i ceppi di *Campylobacter jejuni* ATCC® 33291 (Culti loops ® Oxoid)

9- Valori di riferimento, interpretazione, valori critici

Valore di riferimento :assenza di crescita dei microrganismi patogeni del genere *Campylobacter*. Secondo molti autori, data la frequenza di isolamento di batteri del genere *Campylobacter*, essi devono essere cercati in tutti i campioni di feci diarroiche inviate in laboratorio per la coprocultura di routine. E' importante anche una colorazione di Gram della sospensione fecale; la presenza di bastoncini ad ali di gabbiano, curvi, a S può essere presuntivamente riportata come *Campylobacter* species. Il test dell'idrolisi dell'ippurato è molto più importante della sensibilità all'acido nalidixico per l'identificazione del *C. jejuni* senza ulteriori passaggi.

10- Linearità e limite di rilevamento

Non applicato.

11- Limitazioni del metodo

Paziente in terapia con antibiotici, raccolta inadatta, uso di mezzi di coltura disidratati o scaduti, temperatura di incubazione differente da 37-42 °C.

12- Riferimenti bibliografici

1. Bertomeu A, Ros E, Barragan V, et al: Chronic diarrhea with normal stool and colonic examinations: organic or functional. *J Clin Gastroenterol* 13:531, 1991.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

2. Bytzer P, Stokholm M, Andersen I, et al: Aetiology, medical history, and faecal weight in adult patients referred for diarrhoea: a prospective survey. *Scand J Gastroenterol* 25:572, 1990.
3. Donowitz M, Kokke FT, Saidi R: Evaluation of patients with chronic diarrhea. *N Engl J Med* 332:725, 1995.
4. DuPont HL, and The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology: Guidelines on acute infectious diarrhea in adults. *Am J Gastroenterol* 92:1662, 1997.
5. Feldman R, Banatvala N: The frequency of culturing stools from adults with diarrhoea in Great Britain. *Epidemiol Infect* 113:41, 1994.
6. Nachamkin I. : *Campylobacter* and *Arcobacter* pagg. 716-726 In Patrick R. Murray, Baron E.J., Tauxe F.C., Tenover R.H. Manual of Clinical Microbiology , 7th edition , American Society for Microbiology, 1999 .
7. Nye K.J. , Turner D.J. , Coleman D., Fallon B., Gee S., Messer R., Warren R.E. and Andrews N. :A Comparison of thre isolation rates of Salmonella and thermophilic Campylobacter species after direct inoculation of media with a dilute faecal suspension and undiluted faecal material. *J. Med. Microbiol . Vol (50) , 659-662 (2001)*

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma:	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.